

AMINE BECHELENI PIMENTA

ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA DO EXTRATO
BRUTO DAS PARTES AÉREAS DA *Kielmeyera rubriflora* EM
CAMUNDONGOS.

Dissertação apresentada à Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
área de concentração em Farmacologia, para a
obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Ricardo Stuckert Seixas
Co-orientadora: Profa. Dra. Cynthia Fernandes Ferreira Santos

DIAMANTINA – MG
UFVJM
2014

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

P644a	<p>Pimenta, Amine Becheleni Atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato bruto das partes aéreas da <i>Kielmeyera rubriflora</i> em camundongos. / Amine Becheleni Pimenta. – Diamantina: UFVJM, 2015. 100 p. : il.</p> <p>Orientador: Sérgio Ricardo Stuckert Seixas Coorientadora: Cynthia Fernandes Ferreira Santos</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. <i>Kielmeyera rubriflora</i>. 2. Ansiolítica. 3. Sedativa. 4. antidepressiva. 5. sistema nervoso central. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 615.321</p>
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E ANTIDEPRESSIVA DO EXTRATO
BRUTO DAS PARTES AÉREAS DA *Kielmeyera rubriflora* EM
CAMUNDONGOS.**

Amine Becheleni Pimenta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 19/12/2014

Prof. Guilherme Nogueira Mendes de Oliveira – UFVJM

Prof. ^a Alessandra Duarte Rocha – UNA

Prof. ^a Cynthia Fernandes Ferreira Santos – UFVJM
Co-orientadora

DIAMANTINA

2014

Dedico este trabalho ao Vale do Jequitinhonha.

AGRADECIMENTOS

Ao mais ilustre filho desta terra, JK, por plantar a primeira semente desta universidade.

Aos professores do Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFVJM pela criação e manutenção do curso.

Aos colegas Isabela e Cláudio pelo incentivo à entrada no curso.

Ao Prof. Sérgio Ricardo pela recepção no programa e idealização do projeto.

Aos colegas de curso pelo caloroso acolhimento, pela companhia, pela amizade ao estilo *Vale do Jequitinhonha*.

À professora Cynthia pela receptividade, competência, coragem, dinamismo, paciência, incentivo, bom humor, resolutividade, disposição, benevolência, profissionalismo... Enfim por ser o modelo de como devem ser os professores universitários. Agradeço principalmente por acreditar em mim e em meu projeto.

Ao professor Luiz Elídio pelo projeto da extratoteca e pela cessão do extrato.

Às colegas Bárbara e Débora pela produção do extrato e por seu apoio.

Ao aluno Aventino por sua ajuda na execução dos primeiros experimentos.

Aos professores, funcionários e alunos do curso de fisioterapia pela harmonia que reside naquele prédio.

Aos técnicos de laboratório e pessoal da biblioteca por sua colaboração. Ao pessoal da segurança que jamais faltou com seu dever.

Ao instituto René Rachou (Fiocruz BH) pela doação dos animais e pelos amigos que fizeram seus transportes.

À Santa Casa de Caridade de Diamantina pela doação das drogas utilizadas.

Aos familiares e amigos pelo incentivo.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma.

À Diamantina que nunca será “um retrato na parede”.

Ao pequeno ser, que se chama Lara, por ser a nova inspiração de minha vida.

A Eduardo que perto ou longe esteve junto comigo antes durante e depois de tudo isso com seu apoio incondicional.

A Deus por permitir o motivo de todos estes agradecimentos.

“Quando o português chegou
Debaixo duma bruta chuva
Vestiu o índio
Que pena!
Fosse uma manhã de sol
O índio tinha despido
O português.”
Oswald de Andrade

RESUMO

As plantas do gênero *Kielmeyera*, cujos efeitos farmacológicos já foram demonstrados, são plantas nativas da região do Vale do Jequitinhonha e conhecidas como Pau Santo. A *Kielmeyera rubriflora* é utilizada na medicina caseira, entretanto, até o momento não existem dados disponíveis na literatura de estudos farmacológicos a seu respeito. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos ansiolíticos e antidepressivos do extrato bruto das partes aéreas da *K. rubriflora* sobre a atividade do sistema nervoso central (SNC) de camundongos suíços albinos machos. O extrato bruto das partes aéreas foi administrado via oral nas doses de 100 mg/Kg, 250 mg/Kg e 500 mg/Kg em camundongos albinos, suíços, machos, com idade entre 9 e 13 semanas, com peso entre 25 e 40 g. Foram utilizados os testes de triagem farmacológica comportamental (agudo), movimentação espontânea (agudo), potencialização do tempo de sono induzido por tiopental sódico (agudo), placa perfurada (agudo), labirinto em cruz elevado (agudo), nado forçado (crônico) e suspensão da cauda (crônico). Na de triagem farmacológica comportamental, foram detectados efeitos de depressão do SNC pela dose de 100mg/Kg e de estímulo do SNC nas doses de 250 e 500 mg/Kg. O tempo de sono que foi reduzido pelo extrato em 20 e 26% nas doses de 100 e 500 mg/Kg respectivamente. A ambulação foi significativamente aumentada nas doses de 100 e 500 mg/Kg sugerindo efeito ansiolítico e significativamente diminuída na dose de 250 mg sugerindo efeito sedativo. As propriedades ansiolíticas foram investigadas nos testes da placa perfurada e do labirinto em cruz elevado, onde houve diminuição do tempo de permanência nos braços fechados com a doses de 100mg/Kg e aumento significativo de entradas no braço aberto na doses de 250mg/Kg sugerindo atividade ansiolítica nestas doses. No teste da placa perfurada houve diminuição significativa de mergulhos de cabeça na dose de 250mg/Kg e 500mg/Kg sugerindo ação sedativa e aumento significativo de mergulhos de cabeça na dose de 100 mg/Kg sugerindo ação ansiolítica. A atividade antidepressiva foi investigada com os testes de suspensão da cauda e nado forçado. No teste da suspensão da cauda houve diminuição dose-dependente, porém não significativa do tempo de imobilidade. No teste de nado forçado houve diminuição significativa do tempo de imobilidade em todas as doses investigadas sugerindo atividade antidepressiva, principalmente na dose de 100 mg/Kg. Sendo assim os dados encontrados sugerem ação sedativa, ansiolítica e antidepressiva dose-dependente do extrato bruto da *Kielmeyera rubriflora*.

Palavras-chave: *Kielmeyera rubriflora*, ansiolítica, sedativa, antidepressiva, SNC.

ABSTRACT

The plants of the genus *Kielmeyera*, whose pharmacological effects have been reported, are native to the Vale do Jequitinhonha region and are known as “Pau Santo”. The *Kielmeyera rubriflora* is used in folk medicine; however, no data are available in the literature on pharmacological studies regarding this species. The aim of the study was to evaluate the anxiolytics and antidepressants effects of the crude extract from the aerial parts of *K. rubriflora* activity on the central nervous system (CNS) of Swiss albino male mice. The crude extract of the aerial parts was administered orally at doses of 100 mg/kg, 250 mg/kg and 500 mg/kg to albino Swiss, male mice, between 9 and 13 weeks of age, weighing between 25 and 40 g. Behavioral pharmacological screening (acute), spontaneous movement (acute), potentiation of sleeping time induced by sodium thiopental (acute), elevated plus maze (acute), hole board (acute), forced swimming (chronic) and tail suspension (chronic) tests were performed. In the behavioral pharmacological screening of CNS depression, effects were detected with the 100 mg/kg dose, and CNS stimulation was detected with the doses of 250 and 500 mg/kg. The duration of sleep was reduced by the extract at 20 and 26% with doses 100 and 500 mg/kg, respectively. The ambulation was significantly higher at doses of 100 and 500 mg/kg, suggesting an anxiolytic effect, and significantly lower at a dose of 250 mg, suggesting a sedative effect. Anxiolytic properties were investigated in the tests of the hole board and the elevated plus maze, where there is less time spent in the closed arms with doses of 100 mg/kg and a significant increase in open arms entries with doses of 250 mg/kg, suggesting an anxiolytic activity with these doses. In the hole board test, head dipping decreased significantly with doses of 250 mg/kg and 500 mg/kg, suggesting a sedative action. A significant increase in head dipping was observed with the doses of 100 mg/Kg, suggesting na anxiolytic action. The antidepressant activity was investigated with the tail suspension and forced swim tests. In the tail suspension test, a dose-dependent, but not significant, decrease in the immobility time, was observed. In the forced swim test, a significantly lower immobility time was observed at all the doses, suggesting an antidepressant activity, especially at a dose of 100 mg / kg. Thus, the data suggests a sedative, anxiolytic and antidepressant dose-dependent action of the crude extract of *Kielmeyera rubriflora*.

Keywords: *Kielmeyera rubriflora*, anxiolytic, sedative, antidepressant, CNS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotografia da <i>Kielmeyera rubriflora</i>	33
Figura 2 - Estrutura básica da xantona.....	36
Figura 3 - Caixas dormitório com enriquecimento ambiental.....	41
Figura 4 - Administração por gavagem.....	46
Figura 5 - Fotografia das flores da <i>Kielmeyera rubriflora</i>	47
Figura 6 - Teste da triagem farmacológica comportamental utilizando gaiolas de observação.....	49
Figura 7 - Teste da movimentação espontânea utilizando o Campo Aberto em madeira.....	54
Figura 8 - Teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental.....	55
Figura 9 - Teste do labirinto em cruz elevado- vista superior.....	56
Figura 10 - Teste do labirinto em cruz elevado- vista lateral.....	56
Figura 11 - Teste da atividade ansiolítica utilizando a placa perfurada.....	57
Figura 12 - Teste do nado forçado.....	58
Figura 13 - Teste da suspensão da cauda.....	59
Figura 14 - Exsicata da <i>Kielmeyera rubriflora</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração oral do extrato de <i>Kielmeyera rubriflora</i>	63
Tabela 2 – Número de bolos fecais observados durante a triagem farmacológica comportamental.....	63
Tabela 3 – Tempo de latência para início de sono e tempo de duração do sono induzido por tiopental sódico 80 mg/Kg.....	65
Tabela 4 – Atividade de ambulação (número de quadrantes atravessados no teste do campo aberto)	69
Tabela 5 – Número de levantamentos no teste do campo aberto.....	70
Tabela 6 – Número de autolimpezas no teste do campo aberto.....	71
Tabela 7 – Número de mergulhos na placa perfurada.....	72
Tabela 8 – Teste do labirinto em cruz elevado (número de entradas)	73
Tabela 9 – Teste do labirinto em cruz elevado (tempo de permanência)	74
Tabela 10 – Teste de suspensão da cauda.....	75
Tabela 11 – Teste do nado forçado.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) v.o. sobre a defecação no teste da triagem farmacológica comportamental em camundongos nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos.....64

Gráfico 2 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o tempo de latência para início do sono no teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico em camundongos.....66

Gráfico 3 – Proporção de camundongos em estado de hipnose durante 10800 segundos de observação no teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico com os tratamentos de água destilada, diazepam 5 mg/ Kg (DZP) e *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500).....66

Gráfico 4 – Proporção de camundongos em estado de hipnose por grupo estudado durante 10800 segundos de observação no teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico.....67

Gráfico 5 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o tempo de duração do sono durante a observação no teste de Potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico 80mg/Kg em camundongos.....68

Gráfico 6 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre a atividade de ambulação em camundongos no teste do Campo aberto nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos.....69

Gráfico 7 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de levantamentos em camundongos no teste do Campo aberto nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos.....70

Gráfico 8 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de autolimpezas em camundongos no teste do Campo aberto nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos.....71

Gráfico 9 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de mergulhos de cabeça no teste da Placa perfurada.....72

Gráfico 10 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de entradas nos braços abertos, centro e braços fechados no teste do Labirinto em cruz elevado.....73

Gráfico 11 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o tempo de permanência nos braços abertos, centro e braços fechados no teste do Labirinto em cruz elevado.....74

Gráfico 12 – Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e fluoxetina 20mg/Kg (FLX) v.o. sobre o tempo de imobilidade no teste da Suspensão da cauda.....75

Gráfico 13 – Efeito do extrato de *Kielmeyera rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e fluoxetina 20mg/Kg (FLX) v.o. sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado forçado.....76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental.....	51
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	5-hidroxindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT_{1A}	Receptor da 5-hidroxitriptamina do tipo 1 A
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DL50	Dose Letal de 50 ou dose que mata 50% da população de uma amostra
EKR	Extrato de <i>Kielmeyera rubriflora</i>
DZP	Diazepam
EPM	Erro padrão da media
FLX	Fluoxetina
GABA	Ácido gama aminobutírico
GABA_A	Receptor do Ácido gama amino butírico tipo A
GPDDF/UFVJM	Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitofármacos e Fitoterápicos da UFVJM (GPDDF/UFVJM).
IEF-MG	Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais
IRSS	Inibidor seletivo de receptação de serotonina
L	Litro
LIPEMVALE	Laboratório Integrado de Pesquisas Multiusuário dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri
MAO	Monoamino oxidase
MAO –A	Monoamino oxidase A
MAO-B	Monoamino oxidase B
mg /Kg	Miligramas por quilograma
mg/10ml	Miligramas por 10 mililitros
Min.	Minuto
ml	Mililitros
N=10	O número de animais em cada grupo do teste é igual a 10
N	Número
NEA	Núcleo de Experimentação Animal

OMS	Organização Mundial de Saúde
PIC	Práticas Integrativas e Complementares
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
REAQ	Relação Estrutura-Atividade Quantitativa
Seg.	Segundos
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
UFVJM	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
v.o.	Via Oral

SUMÁRIO

1 <u>INTRODUÇÃO</u>	18
1.1 Psicofármacos e desordens psiquiátricas	18
1.2 Moléculas de medicamentos psicoativos	20
2 <u>OBJETIVO</u>	22
3 <u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	24
3.1 Ansiedade e depressão	24
3.2 Fisiologia da ansiedade e da depressão	27
3.3 Medicamentos de ação sobre o SNC	28
3.3.1 Medicamentos ansiolíticos	29
3.3.2 Medicamentos antidepressivos	29
3.4 Uso das plantas medicinais	30
3.4.1 <i>Kielmeyera rubriflora</i>	32
3.4.2 Constituição química e atividade farmacológica	35
3.4.2.1 Moléculas das xantonas presentes na <i>k. rubriflora</i>	37
4 <u>JUSTIFICATIVA</u>	40
5 <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	42
5.1 MATERIAL	42
5.1.1 Animais	42
5.1.2 Drogas e reagentes	43
5.1.3 Equipamentos e outros materiais	43
5.1.3.1 Equipamentos	43
5.1.3.1.1 Gaiolas de observação	43
5.1.3.1.2 Campo aberto em madeira para estudo de movimentação espontânea	43
5.1.3.1.3 Labirinto em cruz elevado	44
5.1.3.1.4 Placa perfurada	44
5.1.3.1.5 Caixa para suspensão da cauda	44
5.1.3.2 Outros materiais	44
5.2 MÉTODOS	46
5.2.1. Delineamento experimental	46
5.2.2 Material botânico	48
5.2.2.1 Coleta e identificação da planta	48

5.2.2.2 Preparo do extrato	49
5.2.3 FASE I DO ESTUDO	49
5.2.3.1 Triagem farmacológica comportamental	49
5.2.4 FASE II DO ESTUDO (Testes gerais para ação central)	53
5.2.4.1 Teste da movimentação espontânea	53
5.2.4.2 Teste de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico	54
5.2.5 FASE III DO ESTUDO (Testes ansiolíticos de tratamento agudo)	56
5.2.5.1 Teste do labirinto em cruz elevado	56
5.2.5.2 Teste da placa perfurada	57
5.2.6 FASE IV DO ESTUDO (Testes antidepressivos de tratamento crônico)	58
5.2.6.1 Teste do nado forçado	58
5.2.6.2 Teste da suspensão da cauda	59
5.2.7 Finalização humanitária dos animais	60
5.2.8 Análise estatística	61
6 <u>RESULTADOS</u>	64
6.1 FASE I DO ESTUDO	64
6.1.1 Triagem farmacológica comportamental	64
6.2 FASE II DO ESTUDO (Testes gerais para ação central)	67
6.2.1 Teste de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico	67
6.2.2 Efeito do extrato de <i>K. rubriflora</i> no campo aberto	70
6.3 FASE III DO ESTUDO (Testes ansiolíticos de tratamento agudo)	73
6.3.1 Efeito do extrato de <i>K. rubriflora</i> na placa perfurada	73
6.3.2 Efeito do extrato de <i>K. rubriflora</i> no labirinto em cruz elevado	74
6.4 FASE IV DO ESTUDO (Testes antidepressivos de tratamento crônico)	77
6.4.1. Efeito do extrato de <i>K. rubriflora</i> no teste de suspensão da cauda	77
6.4.2 Efeito do extrato de <i>K. rubriflora</i> no teste do Nado Forçado	78
7 <u>DISCUSSÃO DE RESULTADOS</u>	80
8 <u>CONCLUSÃO</u>	88
9 <u>REFERÊNCIAS</u>	90
ANEXO I: Exsicata da <i>Kielmeyera rubriflora</i> - Herbário Jeanine Felfili da UFVJM.	100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Psicofármacos e desordens psiquiátricas

Psicofármacos são medicamentos que agem sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) alterando as funções cerebrais e assim produzindo transitórias mudanças de humor, comportamento e percepção. Apesar dos efeitos subjetivos deste tipo de droga, há 50 anos vêm sendo utilizados modelos de estudos em grupos de animais com resultados convincentes. Estes modelos são largamente utilizados no mundo inteiro e são particularmente úteis na descoberta de fármacos para o tratamento de diversos tipos de depressão e ansiedade, Mal de Alzheimer, dor, esquizofrenia, adicção, epilepsia, entre outros (BUCCAFUSCO, 2009).

O uso de psicofármacos sintéticos é relativamente recente, os primeiros registros datam de 1949 com o uso do Lítio no tratamento de mania e de 1952 quando foram descritos os efeitos antipsicóticos da clorpromazina. Em 1957 já se utilizava o clordiazepóxido que foi um dos primeiros ansiolíticos e cerca de um ano depois conheceu-se a imipramina que foi o primeiro antidepressivo tricíclico. Nesta mesma época a iproniazida, substância inibidora da monoamino oxidase (MAO) utilizada até então no tratamento da tuberculose, apresentava melhora do humor e euforia como efeito colateral (GORENSTEIN & SCAVONE, 1999).

Após o surgimento dos psicofármacos o número de internações hospitalares de pacientes psiquiátricos foi consideravelmente reduzido. Num espaço de tempo relativamente curto, entre 1954 e 1993 houve uma diminuição de 86% de internações de pacientes psicóticos nos EUA. Daí a importância do estudo de novos fármacos nesta área que venham a ser mais efetivos e específicos e com uma carga menor de efeitos indesejados (GORENSTEIN & SCAVONE, 1999).

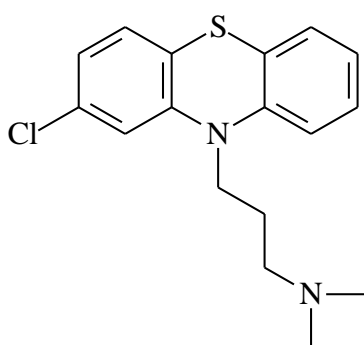
O desenvolvimento de psicofármacos de baixo custo é uma demanda mundial, pois, estima-se que 13% da população mundial acometida por enfermidades portem desordens neuropsiquiátricas. A demanda é tão grande que em 97% dos países, médicos não especialistas receitam medicamentos para desordens psiquiátricas. A mediana de gastos com saúde mental era de 1,63 dólares por pessoa por ano, enquanto metade da população mundial gastava em 2011 mais de 6,81 dólares por ano com medicamentos para desordens mentais e de comportamento. Como os valores são discrepantes de acordo com a região e alguns países populosos ainda possuem políticas de saúde mental deficiente, o consumo de medicamento tende a aumentar na medida que países de baixa e média renda forem se estruturando quanto aos seus programas de saúde. Os gastos com medicamentos são substancialmente maiores que

outros gastos com saúde mental, o que pode contribuir para a diminuição de leitos hospitalares entre 2005 e 2011. Medicamentos usados no tratamento de depressão e ansiedade representam uma boa fatia do mercado econômico mundial, a mediana de gastos com ansiolíticos e antidepressivos per capita por ano é de aproximadamente 82 centavos de dólar e 2,58 dólares respectivamente (WHO, 2011).

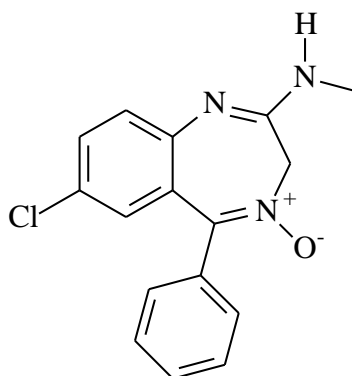
No Brasil existe uma política de saúde mental, bem como uma legislação específica, além do mais, no ano de 2011, os gastos com saúde mental no Brasil representaram 2,38% dos gastos com saúde, em contrapartida apenas 0,32% dos gastos totais com saúde foram destinados a hospitais psiquiátricos. O investimento em hospitais psiquiátricos é baixo quando comparado a outros países o que pode indicar um grande investimento em terapia medicamentosa e criação de rede substitutiva aos hospitais. Sendo assim, o Brasil segue a tendência mundial de aumentar cada vez mais seus gastos com medicamentos para distúrbios psiquiátricos e vale ressaltar que sua política de saúde mental é relativamente recente, portanto, o investimento nos próximos anos deve ser ainda maior (WHO, 2014).

Outra tendência de incentivo e investimento por parte do Ministério da Saúde é o uso e pesquisa de plantas medicinais e fitoterápicos. As plantas medicinais são utilizadas há tempos pelo homem ao redor do mundo e na região do Vale do Jequitinhonha este uso se faz presente tanto com as plantas nativas como com as trazidas de outros ambientes (MATOS, 1998; RIBEIRO, 2006; BRANDÃO, 2009). Entretanto, das plantas nativas cientificamente estudadas sabe-se muito pouco a respeito de suas propriedades farmacológicas. Neste contexto, o intuito do trabalho é investigar o efeito farmacológico de uma planta medicinal de conhecimento popular que é nativa da região, a *Kielmeyera rubriflora*.

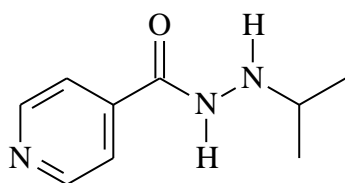
1.2 Moléculas de medicamentos psicoativos.



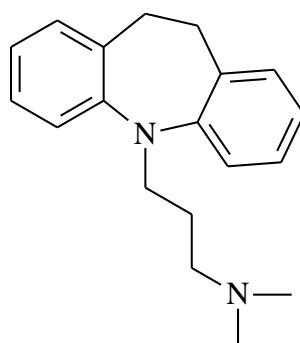
CLORPROMAZINA



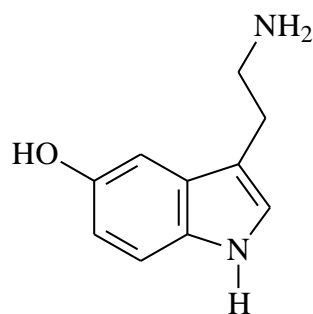
CLORDIAZEPÓXIDO



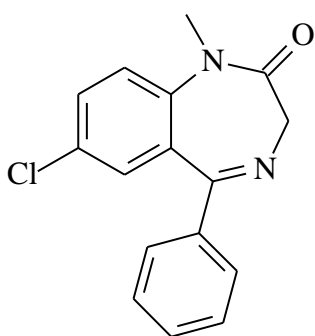
IPRONIAZIDA



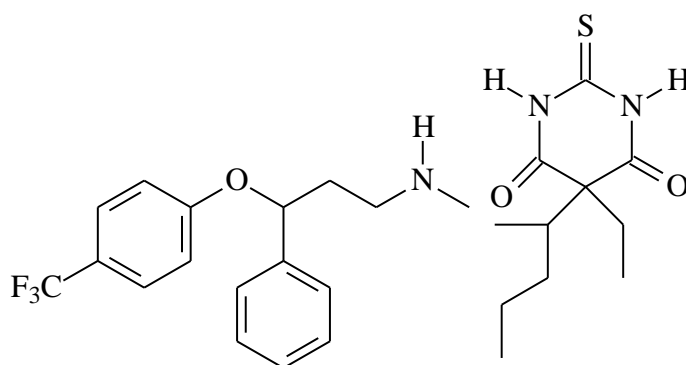
IMIPRAMINA



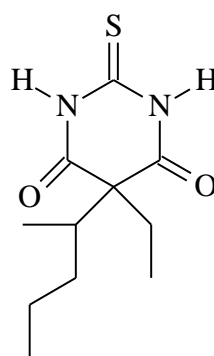
SEROTONINA



DIAZEPAM



FLUOXETINA



TIOPENTAL

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do extrato alcoólico bruto dos ramos da *Kielmeyera rubriflora* sobre o SNC de camundongos.

2.1 Objetivos específicos:

- Realizar uma triagem farmacológica comportamental dos efeitos da *Kielmeyera rubriflora* sobre o SNC.
- Avaliar o potencial indutor de sono do extrato de *Kielmeyera rubriflora*.
- Avaliar os efeitos do extrato de *Kielmeyera rubriflora* sobre a movimentação espontânea.
- Avaliar o potencial ansiolítico do extrato de *Kielmeyera rubriflora*.
- Avaliar o potencial antidepressivo do extrato de *Kielmeyera rubriflora*.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ansiedade e depressão

A ansiedade é um estado emocional adaptativo decorrente de uma condição aversiva que gera incerteza e sentimento de impotência. É até certo ponto uma condição fisiológica, mas quando muito intensa assume uma forma patológica com prejuízos psicológico e social. Relaciona-se a sintomas emocionais e fisiológicos como medo, insegurança, perda de sono, taquicardia, respiração ofegante e rigidez muscular. A ansiedade apresenta ainda sintomas cognitivos como irritabilidade e insegurança, autonômicos como sudorese e diarreia, comportamentais como fobias e compulsões, e ainda manifestações emocionais que se apresentam de modo subjetivo (BRAGA *et al.*, 2010).

Inúmeros estudos sobre o transtorno de ansiedade social apontam a influência negativa de outras desordens envolvendo o SNC como depressão, alcoolismo, fobia e transtorno de ansiedade. Apesar do arsenal terapêutico utilizado nos transtornos de ansiedade, mais de 50% dos portadores destas desordens não respondem satisfatoriamente aos tratamentos de primeira linha podendo não demonstrar alteração de sintomas ou até mesmo apresentar uma piora do quadro (MULULO *et al.*, 2012; MENEZES, FONTENELLE & VERSIANI, 2006; DENT & HOOGENDIJK, 2014).

A cultura do ser humano bem como as condições sociais e econômicas em que vivem influenciam diretamente na taxa de ocorrência da ansiedade em uma população. Esta prevalência pode variar consideravelmente entre populações, por exemplo entre comunidades rurais e populações de grandes centros urbanos, assim como de um país para outro, por exemplo: idosos da área rural da China apresentaram índice de 0,1% contra 9,6% entre idosos peruanos que vivem em centros urbanos. O índice de geração de incapacidade decorrente da enfermidade também varia de acordo com o contexto social do paciente o que pode ser demonstrado pela disparidade dos valores de 2,3% em Cuba contra 46,8 na Índia (PRINA *et al.*, 2011).

Os transtornos de ansiedade são marcados por características próprias em cada fase da vida, na infância e adolescência principalmente afeta o contexto escolar, na fase adulta o trabalho e o convívio em sociedade, já na terceira idade as atividades cotidianas e serviços de saúde. Alguns sintomas aparecem mais frequentemente em certa fase da vida; irritabilidade na infância e idade adulta, fadiga na idade adulta e perda de memória na velhice. Outros sintomas aparecem em todas as fases da vida como perda de sono e sintomas somáticos. Os prejuízos

causados pela ansiedade nos indivíduos em todas as fases da vida quase sempre são relacionados ao seu ambiente de convívio, as crianças perdem o interesse de frequentar a escola, os adultos sofrem incapacidade ocupacional e tanto adultos como idosos passam a usar excessivamente os serviços de saúde. A depressão é uma das principais comorbidades apresentadas pelos pacientes portadores de transtornos de ansiedade e aparece nas três fases da vida. Na fase adulta a ansiedade pode levar ao abuso de substâncias químicas e nos idosos pode resultar em demência (LENZE & WETHERELL, 2011).

ABREU, ACURCIO & RESENDE, 2000, traçaram o perfil de uso de psicotrópicos em pacientes ambulatoriais odontológicos em Minas Gerais e encontraram os seguintes resultados: A maior prevalência de consumo de medicamentos desta classe aparece em indivíduos de união estável (casado/amasiado) mais de 23 anos, do sexo feminino, com a profissão de dona de casa. Os ansiolíticos representaram 40% dos psicotrópicos consumidos pelos pacientes neste estudo.

ANDREATINI *et al.*, 2001, reproduziram o diálogo de pesquisadores brasileiros, europeus e estadunidenses em um simpósio eletrônico organizado pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Nesta conversa revelou-se o consenso comum de que os modelos animais utilizados atualmente nas pesquisas desta área avaliam diferentes tipos de modelos de ansiedade e ainda que estas diferentes manifestações da ansiedade são acompanhadas de distintas alterações hormonais e de modulação de neurotransmissores, assim como diferentes respostas a drogas e de comportamento.

Já a depressão é uma síndrome clínica que diminui a qualidade de vida do paciente, é caracterizada por um mosaico de sintomas com diferentes graus de sofrimento, sintomas estes que não necessariamente estão presentes em todo indivíduo. Entre outros, pode-se citar como sintomas: humor deprimido, tristeza, alterações de peso ou sono, fadiga, sentimento de culpa ou inutilidade, dificuldade de concentração ou tomada de decisão, pensamentos de morte ou suicídio e apatia. Dependendo dos sintomas apresentados, a depressão pode ser dividida em leve, moderada ou grave. Pode ainda ser dividida em melancólica, agitada ou leve. Estas classes podem ainda se subdividir em subclasses como a depressão maior onde o paciente, por pelo menos 2 semanas, perde o interesse por todas ou quase todas as atividades na maior parte do dia. Cada uma destas classes pode ser mais ou menos prevalente de acordo com a idade, classe social, escolaridade, estado civil, situação profissional e nível socioeconômico e presença de comorbidades (SILVA JÚNIOR, 2012).

A depressão é a quarta causa de anos perdidos por incapacidade no mundo, perdendo apenas para infecções respiratórias, doenças diarreicas e desordens perinatais. É também a quarta causa mortis empatada com hepatites B e C, perdendo apenas para tuberculose e Diabetes

Mellitus. A depressão unipolar maior é também uma das comorbidades mais agravantes para outras enfermidades no que diz respeito ao número de mortes e pacientes incapacitados (MURRAY & LOPEZ 1997 a). Estima-se que em 2020 a depressão maior unipolar seja a segunda maior enfermidade causadora de incapacidade no mundo, perdendo apenas para doenças isquêmicas coronárias (MURRAY & LOPEZ, 1997b).

Um estudo epidemiológico aplicado nos EUA estimou que aproximadamente 16% da população apresentará em algum momento da vida ao menos um episódio depressivo. Nos pacientes que sofreram de depressão nos últimos 12 meses que antecederam o estudo a média de duração dos episódios depressivos foi de 16 semanas com média de aproximadamente 36 dias de incapacidade para trabalhar ou desenvolver suas atividades cotidianas. A depressão maior é uma síndrome comum e largamente distribuída na população, os sintomas variam entre leves e muito graves. O estudo revelou ainda que apenas 52% dos indivíduos acometidos pela depressão tiveram tratamento e que destes apenas 42% teve um tratamento considerado adequado resultando em 22% em relação ao total. Dos entrevistados que tiveram episódios nos últimos 12 meses 91% tiveram comprometimento na vida familiar, 80% no trabalho, 85% na vida amorosa e 88% na vida social (KESSLER *et al.*, 2003).

O primeiro antidepressivo utilizado na medicina moderna foi a Iproniazida em 1952 quando foi constatada sua atividade inibidora da enzima monoamino oxidase. Logo após, na década de 1960 os antidepressivos tricíclicos como imipramina começaram a ser usados. Os antidepressivos são úteis no tratamento de depressão maior, pânico, estresse pós traumático, transtorno de ansiedade generalizada, fobia social, distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio de déficit de atenção-hiperatividade e bulimia nervosa (GOODMAN & GILMAN, 2005).

A 5-hidroxitriptamina ou 5-HT ou serotonina é um neurotransmissor envolvido em diversas funções fisiológicas. A serotonina foi identificada em 1930 nas células cromafins e em 1957 foi sugerido que poderia funcionar como um neurotransmissor. Hoje, sabe-se que a serotonina é encontrada nas células cromafins do trato gastrointestinal, nas plaquetas, e no SNC. No SNC está envolvida em funções fisiológicas como o sono, cognição e sensações de cheiro, gosto, visuais, auditivas e de tato. Influencia ainda o apetite, o comportamento sexual, a percepção da dor, a atividade motora e participa da regulação da temperatura. A serotonina é sintetizada nos neurônios a partir do L-triptofano e então armazenada em vesículas que a protegem da degradação pela MAO até que por algum estímulo é liberada na fenda sináptica, daí se liga aos receptores pós sinápticos produzindo reações fisiológicas. A serotonina é então recaptada pelo axônio da fenda sináptica por um transportador dependente de sódio que após fosforilação é internalizado. A MAO que se encontra no citosol transforma a 5-HT em ácido 5-

hidroxindolacetaldeído, este é metabolizado pela aldeído desidrogenase em ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA), o 5-HIAA é transportado para fora do cérebro e excretado pela urina. A depleção da serotonina causa sono e agrava ou induz depressão (GOODMAN & GILMAN, 2005).

3.2 Fisiologia da ansiedade e da depressão

Embora o diagnóstico da depressão seja baseado em exame clínico esta enfermidade é biologicamente caracterizada. A hipótese mais aceita é de que haja deficiência de aminas biogênicas na fenda sináptica, principalmente serotonina, e noradrenalina por este motivo os medicamentos que tratam desta enfermidade melhoraram a disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica. Outra hipótese é que a disponibilidade de transmissão serotoninérgica seja resultado de hipersensibilização de receptores adrenérgicos, pois os antidepressivos diminuem a expressão de receptores beta adrenérgicos junto com a dessensibilização de neurônios inibitórios da serotonina. Por outro lado pacientes deprimidos possuem altos níveis de cortisol resultantes de desequilíbrio no eixo hipotálamo- pituitário-adrenal. Estes altos níveis de cortisol induzem danos neuronais na região do hipocampo podendo levar a apoptose. Processos neuroimunes também estão no rol de possíveis causadores da depressão, pois, glicocorticoides e citocinas inflamatórias também reduzem a síntese de serotonina. Anormalidades do ciclo circadiano também são consideradas fontes de distúrbios de humor, em pacientes deprimidos há alteração dos níveis de uma série de hormônios como: cortisol, tireotropina; prolactina, hormônio do crescimento, e melatonina. Considera-se ainda que certas exposições do indivíduo no início da vida a ambientes sociais e físicos adversos e/ou traumáticos podem acarretar em reprogramação epigenética (modificações no DNA por remodelação da cromatina que regulam a expressão gênica). Estas modificações estão relacionadas à maior propensão a depressão (BENTLEY, PAGALILAUAN, & SIMPSON, 2014; MASSART, MONGEAU & LANFUMEY, 2012; ZHANG *et al.*, 2012).

Já a ansiedade está relacionada a situações de medo e comportamento de fuga, luta e conflito. Biologicamente este enfrentamento do perigo ocorre da seguinte maneira: as amígdalas recebem o estímulo e o enviam para o hipotálamo que envia para a hipófise que por sua vez secreta o hormônio adrenocorticotrófico que estimula a supra-renal a secretar adrenalina, noradrenalina, cortisol e glicocorticoides. Participam ainda deste processo os neurotransmissores: 5-HT, dopamina, ácido gama-aminobutírico (GABA), corticosterona, e os fatores de liberação da corticotropina e colecistocinina. Nesta situação os hormônios e

neurotransmissores liberados fornecem a energia suficiente ao organismo para o comportamento de fuga ou enfrentamento. Pacientes portadores de transtornos de ansiedade possuem transmissão noradrenérgica deficiente enquanto que a 5-HT participa de múltiplos mecanismos possuindo tanto atividade inibitória como de estimulação do SNC. O GABA inibe a transmissão serotoninérgica. A afinidade do GABA ao seu receptor constitui uma importante regulação, quando reduzida resulta em efeito ansiogênico e convulsivo e quando aumentada em efeito anticonvulsivante e/ou ansiolítico (BRAGA et. al, 2010; RODRIGUES, 2011). Assim, várias são as possibilidades de causas da depressão e da ansiedade apontadas pela literatura, constituindo um vasto campo de investigação.

3.3 Medicamentos de ação sobre o SNC

Para melhor compreensão didática as drogas psicoativas foram agrupadas por ALMEIDA & BARBOSA-FILHO, 2006, em 4 grandes grupos brevemente descritos a seguir:

- **Psicoanalépticos** - são substâncias que estimulam a atividade no SNC de modo geral ativando as transmissões neuronais. Este grupo contempla desde estimulantes menores (ex: cafeína) a estimulantes maiores (ex: cocaína), drogas de potencial abusivo como os inibidores de apetite e estimulantes da vigília. São incluídos ainda os agentes convulsivantes, úteis na pesquisa de outros fármacos e por fim os antidepressivos.
- **Psicolépticos** – são drogas que deprimem a atividade do SNC de modo geral dificultando as transmissões neuronais. Nesta classe estão incluídos os neurolépticos ou antipsicóticos, os hipnóticos (medicamentos com potencial indutor de sono), os ansiolíticos, os analgésicos opióides ou analgésicos de ação central, o etanol, os anestésicos e os antiepilépticos ou anticonvulsivantes.
- **Psicodislépticos** – substâncias destituídas de utilidade terapêutica e que perturbam o SNC causando alucinações.
- **Parapsicotrópicos** – são medicamentos de uso neurológico ou psiquiátrico que não se enquadram em nenhuma das classes anteriores. Neste grupo estão os estabilizantes de humor (ex: lítio), drogas que tratam alcoolismo e antiparkinsoninos.

3.3.1 Medicamentos ansiolíticos

A ansiedade é uma emoção humana de cunho adaptativo. Trata-se de um sintoma associado a outras desordens psiquiátricas e não de uma enfermidade em si. Os medicamentos mais usados no tratamento da ansiedade são os inibidores da receptação de serotonina e os benzodiazepínicos. Os benzodiazepínicos possuem utilidade no tratamento de insônia, ansiedade, rigidez muscular e convulsões, estes medicamentos atuam no SNC modulando a atividade GABAérgica. Os receptores GABA_A são canais de cloreto ativados pelo neurotransmissor ácido gama amino butírico (GABA), a ativação dos receptores GABA_A corresponde a maior parte da neurotransmissão inibitória no SNC. Os benzodiazepínicos ligam-se a um receptor específico na superfície neuronal, sua ação agonista facilita a ligação do GABA ao receptor GABA_A modulando a ação deste neurotransmissor com aumento da corrente de cloreto (GOODMAN & GILMAM, 2005).

Tamãha é a importância dos ansiolíticos que o medicamento diazepam está presente na lista de medicamentos disponíveis pelo atendimento primário à saúde em aproximadamente 97% dos países no mundo (WHO, 2005).

Tendo em vista a abrangência dos transtornos de ansiedade e a utilidade dos medicamentos ansiolíticos, a descoberta de uma ação ansiolítica no extrato da *Kielmeyera rubriflora* será de interesse para a saúde pública.

3.3.2 Medicamentos antidepressivos

INIBIDORES DA MAO: A MAO é uma enzima que contém flavina adenina nucleotídeo, está localizada na membrana externa mitocondrial, sua função primordial é degradar monoaminas por desaminação oxidativa no cérebro e nos tecidos periféricos, sendo assim é uma importante enzima metabolizadora para diversos neurotransmissores como serotonina e dopamina. Ocorre na forma de MAO-A e MAO-B que se diferem pela afinidade por substrato e inibidores. A Inibição da MAO preserva o neurotransmissor resultando em efeito clínico equivalente ao seu uso direto. A MAO-A metaboliza preferencialmente serotonina e norepinefrina, seus inibidores seletivos têm demonstrado utilidade no tratamento da depressão. A dopamina é metabolizada pela MAO-A e pela MAO-B. Os inibidores da MAO B são úteis no tratamento da doença de Parkinson. A inativação irreversível da MAO requer a produção de novas enzimas MAO para a cessação do efeito, o que leva em média 1 a 2 semanas. (GOODMAN & GILMAM, 2005; NÚÑEZ *et al.*, 2004; FERNANDES, 1996).

ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS: Os antidepressivos tricíclicos são inibidores da recaptação de norepinefrina e a maioria deles também inibe a recepção de serotonina (GOODMAN & GILMAM, 2005). O antidepressivo tricíclico Amitriptilina está presente na lista de medicamentos disponíveis pelo atendimento primário à saúde em aproximadamente 86% dos países no mundo (WHO, 2005).

IRSS: Os fármacos inibidores de recaptação seletiva de serotonina (IRSS) bloqueiam a recepção de serotonina, a maior disponibilização deste neurotransmissor na fenda sináptica é responsável pelo efeito antidepressivo e também por seus efeitos indesejados. A fluoxetina é um exemplo de IRSS usado no tratamento de depressão, distúrbio obsessivo compulsivo, pânico, fobia social e estresse pós traumático. A meia vida de eliminação da fluoxetina é de 50 horas e a de seu metabólito norfluoxetina de 240 horas (GOODMAN & GILMAM, 2005).

ANTIDEPRESSIVOS ATÍPICOS: Os antidepressivos atípicos além de inibirem a recepção de serotonina apresentam afinidade a outros receptores como os adrenérgicos, dopaminérgicos ou histaminérgicos, além do mais costumam apresentar curta meia vida de eliminação (GOODMAN & GILMAM, 2005).

3.4 Uso das plantas medicinais

Desde os primórdios da humanidade as plantas e seus derivados convivem com o homem em seus “modos de fazer e de viver” e o legado deste conhecimento ao longo dos tempos se desenvolveu, desde hábitos alimentares até o aproveitamento de suas propriedades medicinais no intuito de curar sinais e sintomas das mais variadas enfermidades. Até hoje as plantas são empregadas desde as formas mais simples como um infuso ou macerado, até as mais complexas como as estruturas semissintéticas (MATOS, 1998).

O uso corriqueiro de plantas medicinais, nativas ou não, pela população da cidade de Diamantina e seu entorno, no norte de Minas Gerais, é fruto de um conhecimento da tradição oral que é perpetuado entre as gerações. As plantas nativas são conhecidas pelos indígenas há séculos, entretanto este conhecimento não se vê atualmente aproveitado pelo arsenal terapêutico industrial, sendo até os dias de hoje praticamente restrito à medicina caseira (RIBEIRO, 2006; BRANDÃO, 2009).

A região do Vale do Jequitinhonha sofre influência da cultura portuguesa trazida por seus colonizadores que junto ao conhecimento de suas plantas medicinais trouxeram inúmeras espécies vegetais que se aclimataram ao nosso país. A cultura negra que aqui chegou junto com os portugueses, mesclou seus conhecimentos aos dos portugueses e índios, como citado no

século XIX pelo naturalista Saint Hilaire em viagem ao Arraial do Tejuco, antigo nome da cidade de Diamantina.

As margens desse regaço eram pantanosas e isso foi que fez dar ao lugar o nome de Tijuco, que significa barro na língua dos índios... p. 27
 ...os negros da costa da África têm uma igreja... os negros crioulos têm outra. p.28 ...O clima temperado da capital é propício as produções europeias, e várias plantas de nosso país...estão por assim dizer naturalizadas nas ruas de Tijuco. p. 31 As plantas ornamentais cultivadas nos nossos jardins e transportadas a Tijuco...adotaram, se assim posso expressar me, os hábitos das espécies indígenas...p. 32...chamou minha atenção para um rochedo inclinado, de superfície muito lisa, onde haviam traços grosseiros feitos com uma tinta vermelha. Esses traços representam desenhos de pássaros, uns isolados, outros agrupados de modo bizarro. Os mais antigos habitantes de Tijuco lembram-se de ter visto esses desenhos e todo mundo os atribui aos índios que ocupavam a região antes da chegada dos portugueses...p. 39 (SAINT-HILAIRE, 2004).

Não por acaso, há alguns anos o ministério da saúde tem incentivado o uso de plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS), seja na forma de medicamentos fitoterápicos industrializados, seja no preparo simples das Farmácias Vivas. O estímulo à prática da fitoterapia pelo SUS pode diminuir seu custo em medicamentos, por ser a matéria prima em muitos casos abundante e de fácil produção. É, portanto, desejável que se desenvolvam novos medicamentos produzidos a partir de matéria prima local e que se produzam estudos fitoterápicos suficientes para a produção de Farmácias Vivas (RODRIGUES & AMARAL, 2012).

A quase totalidade dos fitoterápicos industrializados e comercializados atualmente, e que já foram estudados, teve origem no conhecimento popular, entretanto nem todo uso popular é garantia de sucesso terapêutico, sendo este o porquê da necessidade de validação das plantas medicinais. O avanço dos estudos científicos pode corrigir aspectos faltosos do uso popular como a melhor forma de preparo, a melhor parte usada daquela planta e em alguns casos até uma alternativa que não inviabilize a sobrevivência da espécie como o uso de casca e raiz de forma extrativa (DI STASI, 1996).

A confirmação dos efeitos farmacológicos de plantas medicinais de uso na medicina popular é um caminho no desenvolvimento de novos medicamentos. As primeiras Farmacopeias publicaram informações de plantas sobre as quais não havia estudos científicos na naquela época, pode-se compreender portanto que a valorização do conhecimento popular é tão antiga quanto o uso de medicamentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003).

Na década de 70, a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou o Programa de Medicina Tradicional incentivando em todo o mundo desenvolvimento de políticas públicas, bem como estudos científicos para melhor conhecimento de sua segurança, eficácia e qualidade. Mais tarde reafirmou este princípio no documento "Estratégia da OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005" (BRASIL, 2006a).

Nos últimos anos o Brasil tem avançado continuamente no sentido do incentivo à fitoterapia. Em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) foi aprovada através da portaria nº 971 que incentiva a inserção das Práticas Integrativas e Complementares (PICs) em todos os níveis de atenção e recomenda a adoção pelas Secretarias de Saúde dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, da implantação e implementação das ações e serviços relativos as PICs. Poucos meses após a publicação da PNPIC o presidente da república assinou o decreto nº 5.813, este decreto aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que instituiu um grupo de trabalho para elaborar o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicado em 2009 pelo Ministério da Saúde, que entre outros, tem o objetivo de desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, nas diversas fases da cadeia produtiva. Um de seus objetivos específicos é incentivar o desenvolvimento de linhas de pesquisa e implantação de áreas de concentração relacionadas às plantas medicinais e fitoterápicos nos recursos de pós-graduação (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2009).

Em 2009 foi aprovada a Política Estadual de Práticas Integrativas e Complementares no Estado de Minas Gerais através da Resolução/SES nº 1885, que tem como uma de suas diretrizes o estímulo à pesquisa nas Práticas Integrativas Complementares, entre elas a fitoterapia (MINAS GERAIS, 2009).

Através da portaria nº 886, foi instituída a Farmácia Viva no âmbito do SUS. A Farmácia Viva se constitui num modelo de farmácia que, no contexto da Política Nacional de Assistência Farmacêutica, compreende necessariamente o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação e a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2010b).

3.4.1 *Kielmeyera rubriflora*

As plantas do gênero *Kielmeyera* pertencem à família *Clusiaceae*, esta família se dispersa por toda a região tropical do mundo. No Brasil, ocorrem cerca de 18 gêneros e 150

espécies, está presente nas formações naturais em várias partes do país. É uma planta tipicamente do cerrado distribuída no Brasil nos seguintes estados: Pará, Rondônia, Bahia, Mato Grosso, Mato grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Os espécimes desta planta são árvores ou arbustos, com látex de diversas cores, com folhas inteiras, geralmente opostas, simples, sem estípulas, frequentemente carnosas ou coriáceas. As flores são vistosas e podem estar em forma de inflorescência ou não. O fruto geralmente é seco e pode ser em forma de drupa, capsula ou baga, os estames são sempre amarelos. A *Kielmeyera rubriflora* (fig. 1) é popularmente conhecida como Pau Santo, Rosa do Campo, Flor de Santa Rita ou Rosa do Cerrado, na região do cerrado no Brasil é considerada uma planta medicinal. A *Kielmeyera rubriflora* atinge até 1,5 metros de altura, cresce em lugares rochosos, geralmente acima de 500 metros acima do nível do mar, as flores medem entre 6 e 8 cm com pétalas imbricadas rosadas ou avermelhadas, as anteras são amarelas com grãos de pólen pulverulentos, as flores e os frutos aparecem geralmente nos meses de maio e junho (KILLEEN, GARCIA E., BECK, 1993; JOLY, 2002; OLIVEIRA, & MARIMON, 2002; SOUZA & LORENZI, 2008; FORZZA *et al.*, 2010; WOOD, 2011 EVANGELISTA, *et al.*, 2013).



FIGURA 1: Fotografia da *Kielmeyera rubriflora*

FONTE: GENTRY, A.H, 2014

Os extratos de plantas medicinais são compostos por uma variedade de princípios ativos, algumas substâncias foram relatadas pela primeira vez em uma única planta e muitos existem em várias plantas, sobretudo no mesmo gênero ou mesma família. A *Kielmeyera rubriflora* possui compostos de interesse terapêutico, os mais representativos são as xantonas (fig. 2), compostos conhecidos por possuírem atividade inibidora da enzima monoamino oxidase. Algumas destas podem ser encontradas em outras espécies do gênero outras foram relatadas pela primeira vez na *K. rubriflora*.

O primeiro estudo a respeito da *Kielmeyera rubriflora* data de 1971, as cascas e o lenho desta espécie foram coletados na região do Serro em Minas Gerais. Da extração das cascas por benzeno foi isolada a 1,7-dimetoxi 2,3,8-trihidroxixantona. Esta xantona ainda não havia sido encontrada nas outras espécies do gênero *Kielmeyera*. Na extração do lenho por benzeno foram isolados os seguintes compostos xantônicos: 2-hidroxixantona; 2,4-dimetoxi-3-hidroxixantona; 2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona; 4-hidroxi-2,3-etilenodioxixantona; 4-metoxi-2,3-metilenodioxixantona, Kielcorina. Estas xantonas encontradas no lenho já haviam sido isoladas em outras *Kielmeyeras* (GOTTLIEB, LINS MESQUITA, NAGEM, 1971).

Uma das xantonas presentes na *Kielmeyera rubriflora*, a 2-hidroxixantona, exibiu atividade inibidora da MAO, com preferência para a MAO-A: Enzima que metaboliza preferencialmente adrenalina e serotonina. Além da 2-hidroxixantona, até o presente momento não foram encontrados dados publicados que relacionem as outras xantonas constituintes do extrato da *K. rubriflora* com a ansiedade e depressão (FERNANDES, 1996).

O composto 4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona foi primeiramente isolado da *Kielmeyera coriacea*, posteriormente um composto com os mesmos substituintes, porém em posições diferentes, o 2-hidroxi-3,4-dimetoxixantona foi isolado das espécies *Kielmeyera speciosa* St. e *Kielmeyera rubriflora*. Outro composto inédito encontrado na *K. rubriflora* é o 2,3,8-trihidroxi-1,7-dimetoxixantona (GOTTLIEB & NAGEM, 1977; NAGEM, 1973). A similaridade química dos extratos das espécies citadas sugere uma similaridade farmacológica. Sabendo que na *Kielmeyera coriacea* foi demonstrada ação antidepressiva, é interessante investigar se a *K. rubriflora* também o possui.

Mais recentemente foi verificada ainda a presença de flavonoides, taninos e triterpenos, que são grupos de compostos encontrados nas plantas medicinais que apresentam interesse terapêutico (EVANGELISTA, *et al.*, 2013).

Assim as plantas do gênero *Kielmeyera* têm demonstrado uma variedade de utilidades terapêuticas. O extrato alcoólico dos ramos e folhas da *Kielmeyera variabilis* tem uma potencial

atividade antioxidante (COQUEIRO *et al.*, 2013), do extrato dos ramos de *K. variabilis* foi isolada uma mistura de xantonas efetiva contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (PINHEIRO *et al.*, 2003). A *Kielmeyera lathrophyton*, malva do campo ou pau santo, foi avaliada quanto á sua atividade antibacteriana. Foi feita uma extração por cachaça e o extrato foi avaliado em um ensaio de atividade antiviral onde foi demonstrada sua atividade contra o *Staphylococcus aureus* (TOLEDO *et al.*, 2011).

A maioria dos resultados de ação terapêutica encontrados nas *kielmeyeras* é atribuída à presença de xantonas. Entretanto foram encontrados resultados que devem ser associados à presença de outros compostos. Uma mistura de compostos não derivados da xantona extraídos por hexano das cascas da raiz da *Kielmeyera coriacea* foi ativa contra câncer de cólon, leucemia, melanoma e glioblastoma (MESQUITA *et al.*, 2011). A extração hidroalcoólica do caule foi capaz de aumentar significativamente o consumo de oxigênio por mitocôndrias do fígado de ratos wistar e simultaneamente diminuir a gliconeogênese (ZAGOTO *et al.*, 2005). Portanto além das xantonas, outras moléculas presentes nas *Kielmeyeras* constituem alvos potenciais de investigação para tratamento de diversas enfermidades incluindo as desordens psiquiátricas.

3.4.2 Constituição química e atividade farmacológica

As xantonas são estruturas químicas predominantemente presentes nas plantas pertencentes as famílias *Gentianaceae* e *Clusiaceae*, nesta última mais particularmente nas espécies de *Kielmeyera* e de *Hypericum*. São metabólitos secundários que servem supostamente para mediar interações entre a planta e o meio ambiente. Diversas propriedades farmacológicas foram demonstradas nas xantonas, porém sua atividade principal parece ser a inibição da enzima monoamino oxidase, o que sugere ação antidepressiva das plantas ricas destes metabólitos (KUSTER & ROCHA, 2007; FERNANDES, 1996).

A estrutura básica de uma xantona está representada abaixo (Fig. 2), onde cada R representa um átomo de hidrogênio. Nestes sítios foram realizadas substituições de hidrogênios por grupos OH e/ou OCH₃ resultando em 10 moléculas das quais todas exibiram significativa inibição da MAO-A e MAO-B com seletividade marcadamente maior para a MAO-A. Entre estas moléculas está a **2-hidroxixantona** presente na *K. rubriflora* (FERNANDES, 1996).

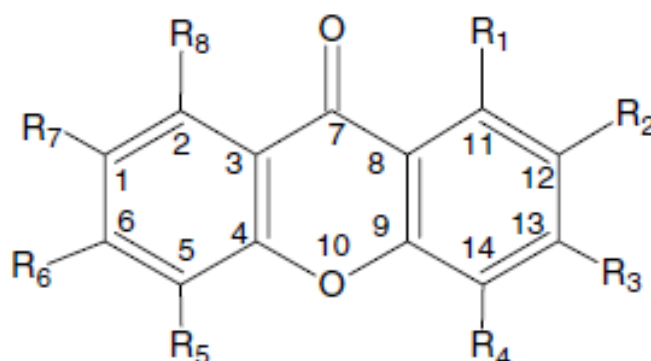


FIGURA 2: Estrutura básica da xantona: Nos sítios representados por R há uma ligação de hidrogênio.
FONTE: NÚÑEZ, 2004

Outros estudos de modificação molecular usando a molécula da xantona como ponto de partida relacionam o desenho de moléculas com a capacidade inibitória da MAO-A com o método REAQ (Relação Estrutura-Atividade Quantitativa) (NÚÑEZ *et al.*, 2004) e atividade anticonvulsivante em estudos pré- clínicos (MARONA *et al.*, 2008) e antiarrítmico e/ou hipotensivo com atividade antagonista $\beta 1$ (MARONA *et al.*, 2009).

Xantonas presentes em outras espécies também exibiram ação sobre o SNC. O extrato da *Gentiana kochiana* exibiu efeito antidepressivo no teste de nado forçado, as xantonas gentiakochianina e gentiacauleina extraídas deste extrato exibiram atividade inibidora da MAO sugerindo que sejam as responsáveis pelo efeito farmacológico (TOMICÍ, 2005). Outra xantona a mangiferina, extraída das folhas e cascas da *Mangifera indica*, produziu significativa melhora de memória em camundongos e prolongamento do tempo de neurodegeneração (BIRADAR, JOSHI & CHEDA, 2012).

A *Kielmeyera coriacea* também é chamada de “pau santo” e usada na medicina caseira. De acordo com a literatura é a espécie de *Kielmeyera* mais estudada. O extrato alcoólico de seu caule administrado por 45 dias diminuiu o tempo de imobilidade de ratos no teste de nado forçado, o que significa um efeito antidepressivo. Os resultados encontrados sugerem que a transmissão serotoninérgica esteja envolvida no efeito antidepressivo deste extrato. *In vitro* a receptação de norepinefrina, dopamina e serotonina foi inibida pelo extrato (GOULART *et al.*, 2007).

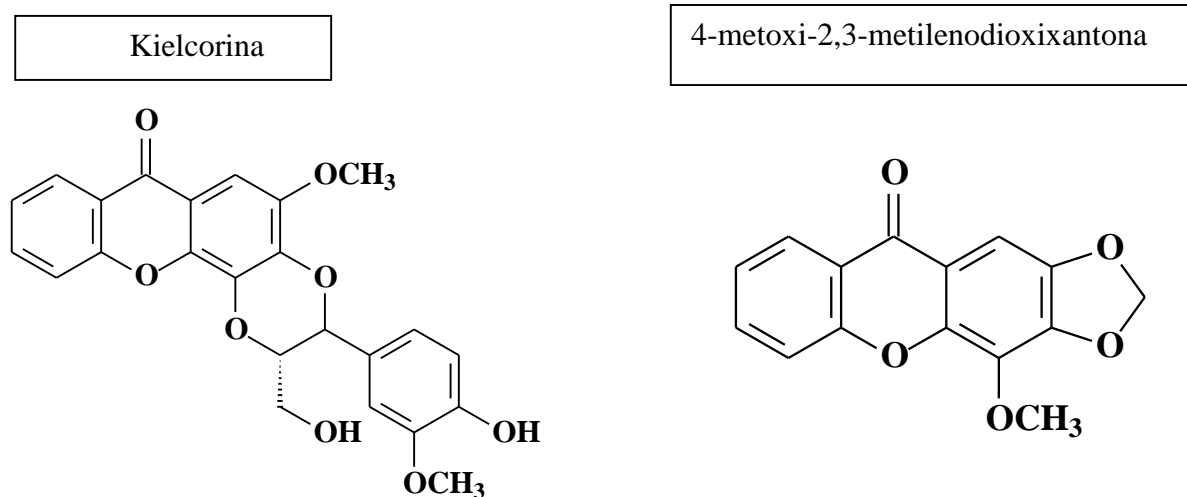
A fração diclorometano da extração alcoólica do caule da *K. coriacea* em uma administração crônica por 45 dia em ratos resultou em efeito antidepressivo no modelo de nado forçado. Sua administração por 21 dias produziu efeito ansiolítico quando estudada no modelo

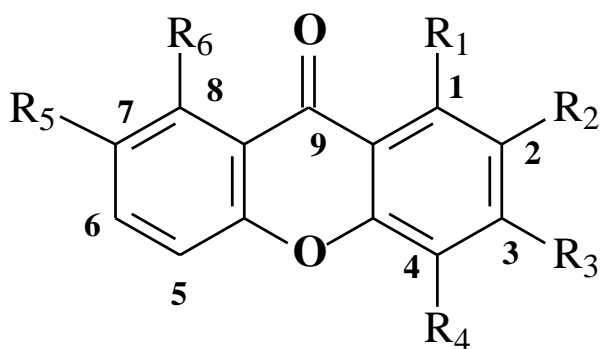
de labirinto em forma de T. No material estudado foram isoladas uma mistura de triterpenos e algumas xantonas, dentre elas a Kielcorina que também está presente na *K. rubriflora* e em mais 3 espécies de *Kielmeyera* (OBICI *et al.*, 2002; BIERSDORF; CORTEZ; AUDI, 2012; MARTINS, 2006; CASTELÃO JR. *et al.*, 1977).

SELA *et al.*, 2010, isolaram a xantona 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona do extrato hidroalcoólico do caule da *K. coriacea* e a patentearam pela Universidade de Maringá. A injeção desta xantona nos núcleos médios da rafe no cérebro resultou em efeito antidepressivo no teste de nado forçado. O composto foi considerado um bom protótipo para o desenvolvimento de drogas úteis para o transtornos do humor, pois, foi caracterizada como antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, este receptor é responsável pela recepção de serotonina.

O extrato da *K. rubriflora* possui uma constituição química semelhante a outros extratos aos quais foram atribuídas propriedades de alteração das atividades do SNC, principalmente atividade antidepressiva. Apesar de até o presente momento, na literatura não se encontrem estudos farmacológicos a respeito desta espécie, os dados apresentados levam a crer que o extrato em estudo possua atividade psicoativa.

3.4.2.1 Xantonas isoladas da *k. rubriflora*.





Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
2-hidroxixantona	H	OH	H	H	H	H
1,7-dimetoxi 2,3,8-triidroxixantona	OCH ₃	OH	OH	H	OCH ₃	OH
2,4-dimetoxi-3-hidroxixantona	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H
2,3-dimetoxi-4-hidroxixantona	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H
2-hidroxi-3,4-dimetoxixantona	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H

JUSTIFICATIVA

4 JUSTIFICATIVA

A demanda por medicamentos usados para o tratamento de desordens psiquiátricas abrange todo o mundo. O desenvolvimento de novos fármacos nesta área amplia o leque de opções terapêuticas podendo reduzir o número e/ou intensidade de efeitos indesejados e melhor resposta farmacológica. Por outro lado, devido ao baixo custo, ao fácil acesso e à boa adesão da população, o Ministério da saúde tem estimulado nos últimos anos o uso e a pesquisa de fitoterápicos no Brasil.

O interesse pelos fitoterápicos tem aumentado expressivamente em todo o mundo, pois, estima-se que o mercado mundial dessa classe de medicamentos já atinja a casa dos 20 bilhões de dólares anualmente. De cada 20.000 moléculas estudadas em estudos pré clínicos como este, apenas 200 chegam aos estudos clínicos e 9 são aprovadas pelos órgãos regulatórios, entretanto, apenas 1 medicamento aprovado satisfaz o mercado, trazendo retorno para a indústria que o desenvolveu (CALIXTO & SIQUEIRA-JR.,2008).

Foi escolhida uma planta nativa da região do Vale do Jequitinhonha, usada na medicina caseira e desprovida de estudos farmacológicos a seu respeito, pois o possível desenvolvimento de um fármaco à partir desta espécie pode contribuir para o desenvolvimento econômico da região, assim como pode compor o rol de produtos de futuras Farmácias Vivas da região.

A presença de compostos derivados da xantona na *Kielmeyera rubriflora* sugere uma ação na enzima inibidora da monoamino oxidase. Além do mais, foram encontrados efeitos ansiolítico e antidepressivo na *Kielmeyera coriacea*. Dado que os constituintes químicos são semelhantes nas duas espécies, espera-se que seja encontrado também ação psicoativa na *Kielmeyera rubriflora* o que justifica a investigação dos efeitos de seu extrato sobre o SNC.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Animais

Para a realização dos testes foram utilizados camundongos suíços (*Mus musculus*), albinos, machos com idade de 11 ± 2 semanas e pesando entre 25 e 40 g.

Os animais foram gentilmente cedidos pelo biotério do Instituto René Rachou (FIOCRUZ MINAS) e transportados para a UFVJM em carro de passeio com ar condicionado em caixas de polipropileno com as dimensões de 49 cm de largura X 32 cm de profundidade X 17 cm de altura, forradas com maravalha (com fatias de maçã para evitar a desidratação). Durante o transporte foram acomodados entre 25 e 33 animais em cada caixa. Após transporte os animais foram aclimatados no biotério do Núcleo de Experimentação Animal (NEA) por no mínimo 10 dias antes dos experimentos.

Os animais foram mantidos em grupos de 10 a 15 animais em caixas de polipropileno tampadas com grade de aço inoxidável nas dimensões 49 cm X 32 cm X 17 cm forradas com maravalha (fig.3). Receberam água filtrada fornecida em garrafas de vidro com bico de aço inoxidável acopladas às tampas das caixas e ração Nuvilab® *ad libitum* (a vontade), exceto nos dias dos experimentos pelo tempo exigido pelo protocolo. A maravalha e a água foram trocadas duas vezes por semana e a reposição de ração foi feita sempre que necessário. Foi oferecido enriquecimento ambiental por um pedaço de 10 cm de cano de PVC colocado em cada caixa pelo pesquisador (TABORDA, MEHNERT & SILVA, 2004; CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2013).



FIGURA 3: Caixas dormitório com enriquecimento ambiental.

FONTE: Arquivo pessoal da autora

As caixas foram mantidas em gabinetes climatizados (Insigth) em temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade de 29% com circulação de ar média e ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 07:00 hs às 19:00 hs e fase escura das 19:00 hs às 07:00 hs), na sala dormitório com exaustor de ar, no biotério do NEA do departamento de Fisioterapia da UFVJM.

A realização dos experimentos foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri CEUA-UFVJM sob o parecer 047/13.

5.1.2 Drogas e reagentes

Água destilada

Solução etanólica a 10% e a 70 %

Cloreto de sódio a 0,9 % - Fresenius Kabi Brasil Ltda

Cloridrato de fluoxetina – gotas- Medley

Diazepam ampola 5 mg/mL- União Química

Extrato alcoólico bruto dos ramos da *Kielmeyera rubriflora* nas concentrações 100mg/10mL, 250mg/10mL e 500mg/10mL

Tiopental sódico – Thiopentax – Cristália

5.1.3 Equipamentos e outros materiais

5.1.3.1 Equipamentos

5.1.3.1.1 Gaiolas de observação

Para cada grupo de tratamento foram utilizadas simultaneamente duas gaiolas de arame pintadas em tinta a óleo branca nas dimensões de 26 cm por 14,5 cm e 17 cm de altura.

5.1.3.1.2 Campo aberto em madeira para estudo de movimentação espontânea.

O campo aberto é construído em madeira com as medidas de 30 cm de largura por 30 cm de profundidade e 30 de altura. É pintado com tinta a óleo branca e no fundo da caixa são riscadas faixas com tinta preta dividindo o espaço em 9 quadrados de 10 cm por 10 cm, estas divisões não impediram ou influenciaram a movimentação animal, apenas viabilizam a

contabilidade de movimentos dos animais. O fundo da caixa foi forrado com filme plástico adesivo transparente para facilitar a limpeza do mesmo (CARLINI, 1973).

5.1.3.1.3 Labirinto em cruz elevado

O aparelho é confeccionado em madeira e revestido de verniz. Ambos os braços medem 30 cm de comprimento por 5 cm de largura e se localizam a 40 cm de altura em relação ao chão, os braços fechados possuem paredes de 30 cm de altura. O centro do aparelho mede 5 cm por 5 cm e é forrado por plástico adesivo branco para melhor visualização da entrada do animal no centro do aparelho (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999).

5.1.3.1.4 Placa perfurada

A placa perfurada é construída em madeira e pintada com tinta a óleo branca. Possui as medidas de 40 cm de largura por 40 cm de profundidade com espessura de 0,5 cm, com pés que a situam a 5 cm do fundo do aparelho. A placa possui 16 furos equidistantes com 3 cm de diâmetro e é encaixada em uma caixa de vidro com profundidade de 40 cm, largura de 40 cm e altura de 30 cm. As medidas do aparelho foram adaptadas no aparelho eletrônico modelo 6650 da marca Ugo Basile (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).

5.1.3.1.5 Caixa para suspensão da cauda

A caixa utilizada no teste de suspensão da cauda é a mesma utilizada no teste de ambulação sendo apenas colocada na bancada de forma que a parte aberta da caixa, que no teste de atividade de ambulação se localiza na parte de cima, se localize então em uma das laterais do aparelho. O ponto de fixação da cauda do animal fica a 30 cm da bancada (CASTAGNÉ, MOSER, & PORSOLT, 2009).

5.1.3.2 Outros materiais

- Bandejas de plástico
- Balança analítica – Modelo Eletronic Balance FA 2104 N – Bioprecisa -
- Balança para pesagem dos animais – Modelo Ux420 H- Marte balanças e aparelhos de precisão Ltda -

- Bastão de vidro
- Béquer de polipropileno 4L
- Béquer de vidro 50 mL
- Bomba a vácuo
- Caneta marcadora para retroprojctor
- Cânula de gavagem
- Cronômetro
- Dessecador a vácuo
- Ebulidor
- Esparadrapo
- Espátula de alumínio
- Estante ventilada - Insigth
- Filmadora - Modelo Handycam DCR SR 21 – Sony e tripé
- Flanela
- Folhas de papel
- Geladeira
- Graal de vidro com pistilo
- Haste flexível de algodão
- Micropipeta – Modelo Research plus 1000 – Eppendorf
- Papel de alumínio
- Papel toalha
- Peneira
- Peneira
- Pinça
- Pipeta graduada de 10 mL – TD – Glasstécnica –
- Seringa de 1 mL
- Suporte para tubos falcom
- Termômetro
- Toalha
- Tubo falcon com 15 e 50 mL
- Vortex –Modelo QL 901- Biomixer

5.2 MÉTODOS

5.2.1. Delineamento experimental:

Para a realização do presente estudo o trabalho foi dividido em 4 fases, a saber:

1) A primeira fase constituiu-se de uma observação comportamental geral para avaliar quais são as possíveis ações do extrato e então direcionar para testes mais específicos, apontar o tempo de leitura dos experimentos seguintes e confirmação das doses a serem investigadas no trabalho. De forma aguda foram observados sinais de alteração sobre o SNC em uma triagem farmacológica comportamental.

2) A segunda fase constituiu-se da caracterização da existência de ação depressora ou estimulante do SNC no extrato, de forma aguda foram realizados os testes de ambulação e de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico.

3) A terceira fase constituiu-se de uma investigação do potencial ansiolítico do extrato por meio dos testes de labirinto em cruz elevado e da placa perfurada, ambos de forma aguda.

4) A quarta e última fase do trabalho constituiu-se de uma investigação do potencial antidepressivo do extrato com estudos crônicos de nado forçado e suspensão da cauda.

Para a realização de cada experimento os animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais com 10 animais escolhidos aleatoriamente que receberam um dos tratamentos descritos abaixo:

Grupo I: Controle negativo, no qual os animais receberam água destilada.

Grupo II: Controle positivo, onde os animais receberam uma droga de referência variando de acordo com o teste aplicado entre fluoxetina na dose de 20 mg por Kg de peso de animal e diazepam 5 mg por Kg de peso de animal.

Grupo III: Grupo experimental de tratamento no qual cada animal recebeu o extrato de *Kielmeyera rubriflora* na dose de 100 mg, por Kg de peso de animal.

Grupo IV: Grupo experimental de tratamento com extrato na dose 250 mg/Kg.

Grupo V: Grupo experimental de tratamento com extrato na dose 500 mg/Kg.

As drogas de referência e extratos foram diluídas imediatamente antes de cada teste na proporção a que cada animal recebesse 10 mL por Kg de seu peso e foram todas agitadas por 10 segundos no vortex imediatamente antes de cada administração. As administrações dos tratamentos foram realizadas por sonda intragástrica (gavagem) como demonstrado na figura 4, exceto o tiopental sódico que foi administrado por via intraperitoneal.



FIGURA 4: Administração por gavagem.

FONTE: Arquivo pessoal da autora.

O tiopental sódico foi diluído em solução salina em seu frasco original e guardado em geladeira em temperatura entre 2 e 8 C°, no momento de uso foi novamente diluído em solução salina e mantido em geladeira durante o tempo de aplicação dos testes.

O diazepam, na forma diluída em 5 mg/mL, acondicionado em ampola injetável foi diluído em água destilada na dose de 5 mg/ 10 mL (ou 5 mg/Kg) e mantido em temperatura ambiente durante o tempo de aplicação dos testes. O diazepam foi escolhido como segundo controle positivo dos testes de potencialização do tempo de sono, e dos testes de investigação de efeitos ansiolíticos.

A fluoxetina, disponível na forma de gotas com 20 mg/mL, também foi diluída em água destilada na dose de 20 mg/ 10 mL (ou 20 mg/Kg) e mantida em temperatura ambiente durante o tempo de aplicação dos testes. A fluoxetina foi o medicamento escolhido como controle positivo nos testes de investigação dos efeitos antidepressivos.

Os experimentos foram todos realizados na sala multiusuário do biotério do Núcleo de Experimentação Animal sempre à mesma hora do dia sendo que, nos dias dos testes, os animais utilizados foram colocados nesta sala em suas próprias caixas dormitório com no mínimo uma hora de antecedência às administrações dos tratamentos. Os animais foram, então, pesados e marcados aproximadamente 30 minutos antes do início de cada bateria de experimento.

Os testes de curta duração foram filmados com uma câmera acoplada a um tripé para que o observador pudesse se ausentar da sala de experimentos durante a aplicação dos testes e deste modo evitar a interferência nos mesmos. Nestes casos os comportamentos foram

posteriormente avaliados. Tanto a posição dos aparelhos como a da câmera não variou durante as experimentações.

A administração dos tratamentos em cada animal foi aleatória e realizada com intervalos de tempo compatíveis com a posterior realização de todos os procedimentos necessários aos testes.

5.2.2 Material botânico

O extrato seco por extração alcoólica de *Kielmeyera rubriflora* é constituinte da extratoteca do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Fitofármacos e Fitoterápicos da UFVJM (GPDPF/UFVJM), foi preparado no Laboratório Integrado de Pesquisas Multiusuário dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (LIPEMVALE) e gentilmente cedido pela equipe do Professor Doutor Luiz Elídio Gregório.

5.2.2.1 Coleta e identificação da planta

Os espécimes de *Kielmeyera rubriflora* Cambess (figura 5) foram coletados em Fevereiro de 2013 no Parque Estadual do Biribiri na cidade de Diamantina no estado de Minas Gerais em local de altitude 1118 m em relação ao nível do mar e seguintes coordenadas: 18°11'14,11"S e 43°37'13,91"W.



FIGURA 5: Fotografia das flores da *Kielmeyera rubriflora*.

FONTE: DE DEUS, 2011 (esquerda); WOOD, 2011 (direita).

A coleta foi realizada com base em licença obtida junto ao Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais - IEF-MG: COL 085/12 válida para o período de 06/2012 a 06/2013.

Uma exsicata da planta está arquivada no Herbário Jeanine Felfili da UFVJM sob o número de coletor LEG 49, onde aguarda número de identificação.

5.2.2.2 Preparo do extrato

Após a coleta e identificação, as partes aéreas da planta foram desidratadas em estufa de ar circulante a cerca de 40°C por aproximadamente uma semana e pulverizadas em moinho de facas.

Foi preparado um extrato etanólico por maceração, usando como solvente etanol 96%, na razão 1:10 p/v. Para cada litro de preparação foram colocados em um erlenmeyer 100 g da droga pulverizada e 1 litro de etanol, o recipiente foi tampado com filme plástico e repousado na bancada do laboratório por uma semana em temperatura ambiente. Após esta maceração o extrato foi filtrado com papel de filtro e concentrado em rota evaporador a temperatura de 40°C até o volume de aproximadamente 30 mL. O produto concentrado foi acondicionado em frascos de vidro âmbar em bancada do próprio laboratório de produção até que o restante de álcool presente no extrato se evaporasse quase por completo, quando por fim foram acondicionados em dessecador a vácuo (Brasil, 2010a). Cada 100 gramas de planta seca e pulverizado rendeu 1 grama de extrato seco.

Após secagem completa, logo antes dos tratamentos os extratos foram raspados, transferidos para um graal de vidro, triturados e diluídos em água destilada e transferidas para tubos Falcon. Como o camundongo deve receber 10 mL/Kg (CARLINI, 1973) as diluições foram feitas nas proporções de 100 mg/10 mL, 250 mg/10 mL e 500 mg/10 mL.

5.2.3 FASE I DO ESTUDO

5.2.3.1 Triagem farmacológica comportamental

Inicialmente foi realizada a triagem farmacológica comportamental que é um teste geral investigativo de possíveis ações da droga sobre o SNC e efeitos autonômicos. O resultado deste teste direciona o estudo para outros testes mais específicos como os que investigam atividade antidepressiva, ansiolítica, neuroléptica, anticonvulsivante e analgésica (ALMEIDA, 2006).

Os animais usados neste teste tinham idade entre 10 e 12 semanas e pesavam entre 29 e 43 g, as observações foram feitas na parte da tarde e a temperatura ambiente permaneceu em 22° C.

Neste teste os animais de cada grupo foram avaliados de uma só vez. Nos dias de avaliação um grupo de 10 animais foi escolhido aleatoriamente e colocado em uma caixa dormitório forrada com maravalha que foi posta na sala de experimentos 4 horas antes das administrações sem água e alimentação. Os animais de cada grupo avaliado receberam um dos tratamentos a seguir: água destilada, extrato seco de *Kielmeyera rubriflora* 100mg/Kg; (EKR-100); extrato seco de *Kielmeyera rubriflora* 250mg/Kg (EKR-250); extrato seco de *Kielmeyera rubriflora* 500mg/Kg (EKR-500) e colocados em duas gaiolas como demonstrado na figura 6. Estas gaiolas foram dispostas lado a lado em uma bancada de modo a facilitar a observação e sob cada uma foi colocada uma folha de papel branco. A cada intervalo de tempo foi trocado o papel sob as bandejas. Aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos uma série de comportamentos foi observada e registrada em ficha específica de acordo com a metodologia descrita por ALMEIDA, 2006.



FIGURA 6: Teste da triagem farmacológica comportamental utilizando gaiolas de observação.

FONTE: Arquivo pessoal da autora.

Os efeitos indicativos de estímulo do SNC avaliados foram: agressividade; ambulação aumentada; andar em círculo; autolimpeza; bocejo; contorções abdominais; convulsões; escalar; estereotípias; irritabilidade; levantar; movimentação intensa das vibrissas; pedalar; sacudir a cabeça; saltos; tremores; vocalização. Os efeitos indicativos de depressão do SNC avaliados foram: abdução das patas do trem posterior; analgesia/antinocicepção; anestesia; ataxia ou incordenação motora; cauda de Straub; hipnose; perda do reflexo auricular; perda do reflexo corneal; ptose palpebral; reflexo de endireitamento: resposta ao toque diminuída; sedação. Os sinais indicativos de efeitos autonômicos avaliados foram: cianose; constipação; defecação; diarreia; força para agarrar; lacrimejamento; micção; piloereção; respiração; salivação; tônus muscular. Também foi avaliado se houve alguma morte no período de 24 horas e 72 horas (Quadro I).

Quantificação dos efeitos: (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso					
ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	30'	1 h	2h	3h	4h
1. SNC					
Estimulantes:					
Agressividade:					
Ambulação aumentada:					
Andar em círculo:					
Autolimpeza:					
Bocejo:					
Contorções abdominais:					
Convulsões:					
Escarar:					
Estereotipia:					
Irritabilidade:					
Levantar:					
Movimentação intensa das vibrissas:					
Pedalar:					
Sacudir a cabeça:					
Saltos:					
Tremores:					
Vocalização:					
Depressores					
Abdução das patas do trem posterior:					
Ambulação diminuída:					
Analgesia/ Antinocicepção:					
Anestesia:					
Ataxia ou incordenação motora:					
Catatonía:					
Cauda de Straub:					
Hipnose:					
Perda do reflexo auricular:					
Perda do reflexo corneal:					
Ptose palpebral:					
Reflexo de endireitamento:					
Resposta ao toque diminuída:					
Sedação:					
2. SNA					
Cianose:					
Constipação:					
Defecação:					
Diarreia:					
Salivação:					
Lacrimejamento:					
Micção:					
Piloereção:					
Respiração:					
Força para agarrar:					
Tônus muscular:					
3. MORTES					

Quadro 1: Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental. Fonte: ALMEIDA, 2006

5.2.4 FASE II DO ESTUDO (Testes gerais para ação central)

Nesta fase do estudo os tratamentos foram administrados de forma aguda com observações de até 4 horas após as administrações dos tratamentos.

5.2.4.1 Teste da movimentação espontânea

O teste da movimentação espontânea tem como objetivo investigar se o extrato estudado tem atividade excitante ou depressora do SNC. Fármacos excitantes de modo geral aumentam a ambulação do animal e por outro lado as substâncias depressoras do SNC diminuem a sua movimentação dentro do aparelho (CARLINI, 1973).

Neste teste os animais foram divididos entre cinco grupos, que receberam cada um uma das três doses do extrato, água destilada como controle e diazepam 5 mg/Kg como segundo controle.

Cada animal foi colocado individualmente no centro da caixa de atividade trinta minutos após a administração dos tratamentos. O tempo total desta primeira parte do teste foi de 10 minutos, sendo que apenas os últimos 5 minutos foram avaliados. Ao ser colocado em ambiente estranho o animal apresenta comportamento natural de exploração. Para evitar que esta exploração interfira na leitura do experimento os primeiros 5 minutos de contato do animal com a caixa de atividade não são contabilizados (ALMEIDA, 2006).

Aos 60 minutos após a administração dos extratos cada animal foi novamente colocado na caixa por mais 5 minutos e aos 120 minutos após as administrações foi posto uma última vez por mais cinco minutos (CARLINI, 1973; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).

A caixa de atividade (figura 7) foi colocada em local marcado no chão da sala de experimentos e todos os dias a que se seguiram estes testes a caixa foi sempre colocada exatamente no mesmo local. O tripé de suporte da máquina filmadora também foi colocado em local marcado e sua posição não variou durante os experimentos.



FIGURA 7: Teste da movimentação espontânea utilizando o Campo Aberto em madeira.

FONTE: Arquivo pessoal da autora.

Durante os testes não houve movimentação de pessoas no laboratório, o pesquisador se manteve a 6 metros de distância em silêncio de modo a verificar se o animal pudesse alcançar as bordas da caixa e caso acontecesse o animal seria imediatamente recolocado no meio da caixa.

Entre um animal testado e outro a caixa foi limpa com papel toalha embebido em álcool 70% para evitar a interferência de odores de um animal no teste do outro.

Posteriormente às filmagens, cada período de teste foi observado e foi contabilizada a quantidade de quadrados atravessados com as 4 patas pelo animal, o número de levantamentos sobre as patas traseiras e o número de autolimpezas.

5.2.4.2 Teste de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico

Este teste investiga se o extrato possui um efeito depressor sobre o SNC prolongando o tempo de sono dos animais por efeito somatório com outra droga depressora (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).

Neste teste os animais foram divididos entre cinco grupos que receberam um dos tratamentos a seguir: EKR-100; EKR-250; EKR-500, água destilada como controle negativo e diazepam 5 mg/Kg como um segundo controle, o controle positivo. O diazepam na dose 5 mg/Kg foi o controle escolhido por ser o mesmo utilizado nos testes ansiolíticos que se seguem.

Trinta minutos após os tratamentos os animais receberam tiopental sódico por injeção intraperitoneal. Imediatamente após a aplicação do tiopental o cronômetro foi acionado e o animal foi colocado sozinho em uma bandeja de polipropileno previamente higienizada com álcool 70%. O animal foi observado até ficar cambaleante ou imóvel, então foi colocado na posição de decúbito dorsal até perder seu reflexo de endireitamento, ou seja, quando perdesse a capacidade de voltar para a posição natural colocando as 4 patas no fundo da bandeja. O animal foi observado até que recuperasse o reflexo de endireitamento por 3 vezes consecutivas, quando foi considerado o tempo final do sono. Sendo assim o tempo de latência para o início do sono foi considerado o tempo entre a aplicação do tiopental sódico e a perda do reflexo de endireitamento e o tempo total de duração do sono foi considerado o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).

Durante todo o tempo de aplicação dos testes os animais foram diretamente observados pelo pesquisador e fixou-se um tempo máximo de observação de 3 horas de sono para cada animal, quando o animal não acordou dentro deste período foi considerado que dormiu por 3 horas (BUENO, 2005). Os animais em fase de recuperação do reflexo de endireitamento estão retratados na figura 8.

.....



FIGURA 8: Teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico.

FONTE: Arquivo pessoal da autora. Na foto os animais começam a recuperar o reflexo de endireitamento.

5.2.5 FASE III DO ESTUDO (Testes ansiolíticos de tratamento agudo)

Nesta fase do estudo os tratamentos foram administrados de forma aguda. Em ambos os testes a seguir, entre a colocação de um animal e outro nos aparelhos houve um curto espaço de tempo, por este motivo os aparelhos foram higienizados com álcool a 10% de modo a evitar que uma graduação alcoólica maior irritasse os animais influenciando no seu comportamento natural.

Os animais foram escolhidos aleatoriamente e distribuídos em cinco grupos de tratamento: água destilada, diazepam 5 mg/Kg; EKR-100; EKR-250; EKR-500.

As observações ocorreram 1 hora após as administrações dos tratamentos e os dados coletados foram expressos em segundos.

5.2.5.1 Teste do labirinto em cruz elevado

Após a administração dos tratamentos cada animal foi colocado no centro do labirinto com a cabeça voltada para o mesmo braço aberto e a movimentação foi filmada por 5 minutos.

A leitura do experimento foi realizada posteriormente, quando se observou o tempo de permanência de cada animal em cada braço (figuras 9 e 10) e no centro do aparelho, bem como o número de entradas em cada uma destas partes. O comportamento natural dos camundongos é de evitar locais abertos e elevados, pois são fatores que causam estresse no animal. Sob efeito de uma substância de ação ansiolítica o animal permanece por mais tempo nos braços abertos (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).



FIGURA 9: Teste do labirinto em cruz elevado- vista superior



FIGURA 10: Teste do labirinto em cruz elevado- vista lateral.

FONTE (9 e 10): Arquivo pessoal da autora

5.2.5.2 Teste da placa perfurada:

Este teste baseia-se na atividade natural de exploração de camundongos quando expostos a um ambiente estranho, quando o animal está sob efeito de um fármaco ansiolítico há um aumento do comportamento de mergulhar a cabeça nos furos da placa, pois a medida que perde o medo tende ao aumento do comportamento de exploração (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).

Uma hora após a administração dos tratamentos, cada animal individualmente foi colocado no centro da placa perfurada e filmado por 5 minutos (figura 11). Posteriormente, as filmagens foram assistidas e foi contabilizado o número de vezes que o animal mergulhou a cabeça nos furos da placa durante os 5 minutos estabelecidos. Os mergulhos foram considerados válidos quando a cabeça abaixou pelo menos o suficiente para os olhos estarem imersos no orifício (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).



FIGURA 11: Teste da atividade ansiolítica utilizando a placa perfurada.

FONTE: Arquivo pessoal da autora.

5.2.6 FASE IV DO ESTUDO (Testes antidepressivos de tratamento crônico)

Os animais receberam aleatoriamente um dos tratamentos: água destilada, EKR-100, EKR-250, EKR-500 e fluoxetina 20 mg/Kg. Cada tratamento foi administrado em dois animais da caixa por 14 dias. No último dia de tratamento os testes foram aplicados 1 hora após as administrações. As observações ocorreram 1 hora após as administrações dos tratamentos e os dados coletados foram expressos em segundos.

Segundo CASTAGNÉ, MOSER, & PORSOLT, 2009, em ambos os testes a seguir o tempo de imobilidade do animal é relacionado a um estado de desânimo ou desesperança. Este tempo de imobilidade bem como o tempo para o início da imobilidade é reduzido por fármacos de ação antidepressiva, pois ambos os testes são modelos preditivos de resposta a medicamentos antidepressivos.

5.2.6.1 Teste do nado forçado

Um dia antes do teste os animais foram adaptados para aprender sobre o caráter inescapável do ambiente. Para isso, em um béquer de 4 litros, com água a 25 ± 1 C° até 17 cm do fundo, foram colocados 5 camundongos juntos por 15 minutos. Passados os 15 minutos os animais foram retirados com uma peneira de plástico, secados com toalha felpuda e devolvidos

para sua caixa dormitório. Com os outros 5 animais foi feito o mesmo procedimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006).

Nos dias dos experimentos cada animal foi posto individualmente no centro do béquer, preparado como descrito anteriormente, e nadou por 6 minutos que foram filmados. Os dois primeiros minutos do teste foram desprezados e cada animal foi observado, então, durante os últimos 4 minutos da filmagem. Os tempos em que o animal realizou movimentos mínimos para boiar foram somados e esta soma foi considerada o tempo total de imobilidade. Visto que a câmera filmou a parte superior do béquer, foi considerado que o animal realizou movimentos mínimos quando: seu dorso não se movimentou sobre a água; sua cauda permaneceu imóvel; o animal não tentou escalar as paredes do béquer e não debateu-se com as patas (figura 12) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006; CASTAGNÉ, MOSER, & PORSOLT, 2009).



FIGURA 12: Teste do nado forçado.

FONTE: Arquivo pessoal da autora.

5.2.6.2 Teste da suspensão da cauda

Cada animal foi avaliado individualmente. O camundongo foi suspenso pela cauda e preso em uma superfície a 30 cm da bancada com uma tira de esparadrapo a 1 cm do final da cauda (figura 13). Cada animal foi suspenso por 6 minutos que foram filmados onde os 2

primeiros minutos do vídeo foram desprezados e os últimos 4 minutos avaliados. Os tempos em que o animal ficou imóvel foram somados e esta soma foi considerada o tempo total de imobilidade. Ressaltando que a imobilidade representa um estado de desânimo ou desesperança comportamental que vem a ser relacionado com um estado depressivo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003; ALMEIDA, 2006; CASTAGNÉ, MOSER, & PORSOLT, 2009).



FIGURA 13: Teste da suspensão da cauda

FONTE: Arquivo pessoal da autora

5.2.7 Finalização humanitária dos animais

Após os testes os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de tiopental sódico em dose letal conforme recomendado pela Diretriz de Eutanásia (CONCEA, 2013).

5.2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e os grupos experimentais foram comparados aos seus respectivos controles. Para a contagem do tempo de sono durante a observação no Teste de potencialização do sono induzido por tiopental sódico foi usado o teste estatístico de Análise de Sobrevida de Kaplan Meier. Os resultados dos demais testes farmacológicos foram analisados pelos testes estatísticos de Análise de Variância -ANOVA- utilizando Modelos Lineares Generalizados por Diferença Mínima Significativa com o modelo Linear de Log de Poisson para contagem de número de eventos e o modelo Gama com Link de Log para a contagens simples de tempo.

Foram considerados intervalos de confiança de 95% e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

O tratamento dos dados obtidos e análises foram realizados com o pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 FASE I DO ESTUDO

6.1.1 Triagem farmacológica comportamental

Os resultados obtidos à partir da triagem farmacológica comportamental dos camundongos tratados de forma aguda com EKR-100, EKR-250 e EKR-500 pela via oral (gavagem), estão apresentados na tabela 1.

Como pode ser observado na tabela 1, nas doses testadas ocorreu uma tendência do extrato em exacerbar os efeitos excitantes centrais. A ambulação foi aumentada nos intervalos de 30 e 60 minutos nos animais que receberam a dose de 250 mg/Kg e nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos nos animais que receberam a dose de 500 mg/Kg.

O comportamento de andar em círculo apareceu apenas com a administração da dose de 250 mg/Kg em 2, 3 e 4 horas após a administração do extrato. O comportamento de auto-limpeza foi acentuadamente aumentado com a dose de 250 mg/Kg nos intervalos até a terceira hora de leitura. O comportamento de escalar foi diminuído nas doses de 100 mg/Kg e 500 mg/Kg e aumentado na dose de 250 mg/Kg.

Na administração de 250 mg/Kg houve saltos na observação de 2 horas e na de 500 mg/Kg houve vocalização na observação de 4 horas. O número de bolos fecais foi aumentado com a administração de todas as doses e na dose de 500 mg/Kg houve diarreia.

Dose (mg/Kg, v.o)	Tempo (min.)	ALTERAÇÕES OBSERVADAS
100	30	-----
	60	Escalar (-)
	120	Escalar (-)
	180	Escalar (-)
	240	Escalar (-), Levantar (-), Auto limpeza (+)
250	30	Ambulação aumentada (+), Auto limpeza (++), Escalar (++), Levantar (-)
	60	Ambulação aumentada (+), Auto limpeza (++), Escalar (++)
	120	Andar em círculo (+), Auto limpeza (++), Saltos (+)
	180	Andar em círculo (+), Auto limpeza (++),
	240	Andar em círculo (+), Auto limpeza (+), Levantar (+)
500	30	Ambulação aumentada (+)
	60	Ambulação aumentada (+), Escalar (-), Diarréia (+)
	120	Ambulação aumentada (+), Escalar (-)
	180	-----
	240	Auto limpeza (+), Escalar (+), Levantar (+), Vocalização (+)

[(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n=10

Dados expressos em números brutos para cada grupo em cada intervalo de tempo, n=10.

TABELA 1 - Alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração oral do extrato de *Kielmeyera rubriflora*.

A tabela 2 apresenta o número de bolos fecais de cada grupo. No geral houve aumento de bolos fecais com a administração das três doses do extrato como pode ser observado no gráfico 1, sendo que o total acumulado de todos os grupos que receberam extrato foi maior que o total acumulado do grupo que recebeu água destilada. Em relação ao grupo água, o total de bolos fecais acumulados foi de 303,85% para o grupo EKR-100, 265,38% para o grupo EKR-250 e de 365,38% para o grupo EKR-500.

Tratamento	30 min.	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.	Total acumulado
Água	07	04	10	3	2	26
EKR-100	23	22	05	20	09	79
EKR-250	20	04	22	13	10	69
EKR-500	23	28	09	16	19	95

TABELA 2 – Número de bolos fecais observados durante a triagem farmacológica comportamental.

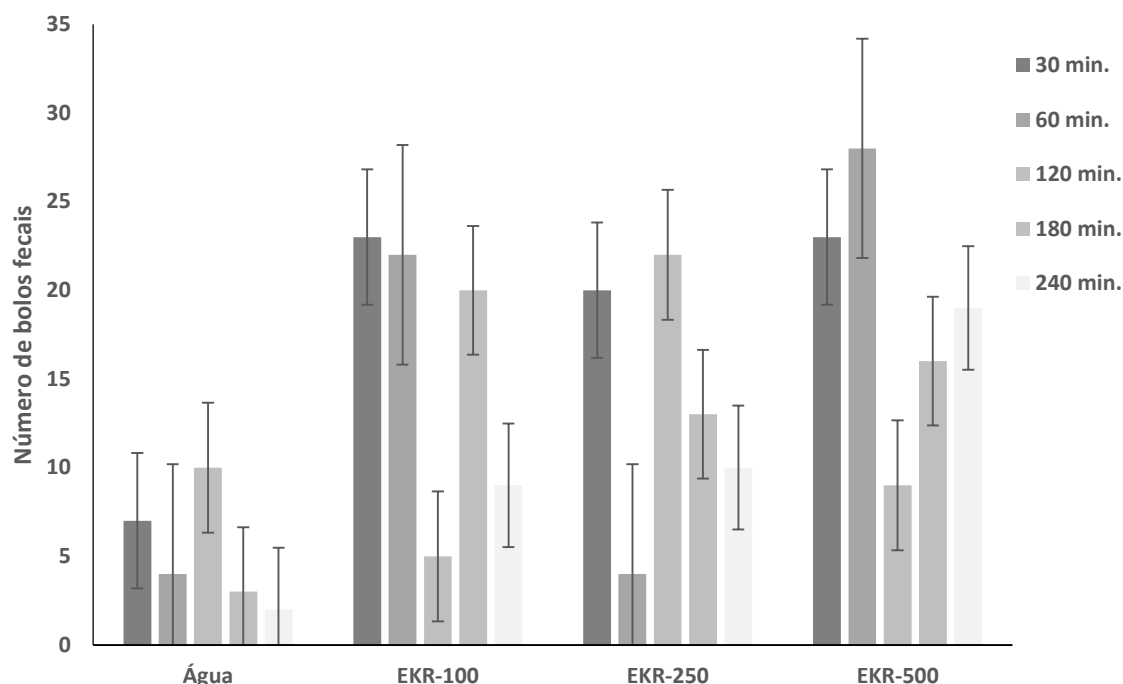


GRÁFICO 1: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) v.o. sobre a defecação no teste da triagem farmacológica comportamental em camundongos nos intervalos de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos. Os valores são os dados brutos de cada grupo com n=10.

Uma das reações avaliadas pela triagem é a catatonia, esta é caracterizada por contração muscular decorrente de uma ação dopaminérgica da droga. O animal fica parado por alguns minutos na mesma posição quando é colocado com as patas dianteiras sobre o bastão de vidro e as patas traseiras sobre a bancada. Outro sinal avaliado é a ptose palpebral ou fechamento espontâneo das pálpebras. Ambos são efeitos colaterais dos neurolépticos, também chamados de antipsicóticos, decorrentes da diminuição da transmissão dopaminérgica (CHATTERJEE *et al.*, 2012; PINTO, 2011). Na triagem inicial não houve sinais de catatonia e tampouco de ptose palpebral. Tanto os animais que receberam água destilada como os animais que receberam qualquer das doses do extrato permaneceram agarrados à barra apenas por alguns segundos. Com estes resultados a hipótese de ação neuroléptica do extrato foi descartada e portanto não se procedeu seus testes específicos, entretanto é bom lembrar que estes resultados por si só não descartam a possibilidade de uma ação neuroléptica atípica.

Não houve alteração de reflexo de dor quando os animais tiveram suas caudas apertadas com uma pinça, por este motivo não houve direcionamento para testes específicos de atividade analgésica/antinociceptiva (BENEDITO, R. B., 2009).

A Dose Letal 50 (DL 50) é a dose capaz de causar a morte em 50% dos animais em estudo, geralmente este é o primeiro passo na triagem de plantas medicinais (AKHILA, DEEPA & ALWAR, 2007). Entretanto por questões técnicas o presente trabalho não contemplou a determinação da Dose Letal. As três doses usadas na triagem farmacológica apresentaram comportamentos indicativos de efeito sobre o SNC e nenhuma das doses estudadas provocou a morte de algum animal ou sinais de toxicidade no prazo de 72 horas após a administração dos tratamentos, logo nos testes que se seguiram foram aplicadas as doses estudadas na triagem inicial.

6.2 FASE II DO ESTUDO (Testes gerais para ação central)

6.2.1 Teste de potencialização do tempo de sono induzido por barbitúrico

Neste teste foram analisados os parâmetros de sono induzido por tiopental sódico 80 mg/Kg como mostrado na tabela 3 e gráfico 2. Nenhum dos tratamentos administrados alterou significativamente o tempo de latência para o sono induzido pelo tiopental sódico.

Grupo/ dose - mg/Kg	Tempo de Latência (segundos)	Tempo de Sono (segundos)
Água 10 ml	186,20 ± 45,78	5998,90 ± 1338,55
DZP 5	118,30 ± 17,49	10446,30 ± 353,70*
EKR-100	124,90 ± 8,51	4795,70 ± 1380,81
EKR-250	191,80 ± 79,19	5894,50 ± 1435,06
EKR-500	159,50 ± 27,03	4460,10 ± 1426,34

TABELA 3 – Tempo de latência para início de sono e tempo de duração do sono induzido por tiopental sódico 80 mg/Kg. Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05.

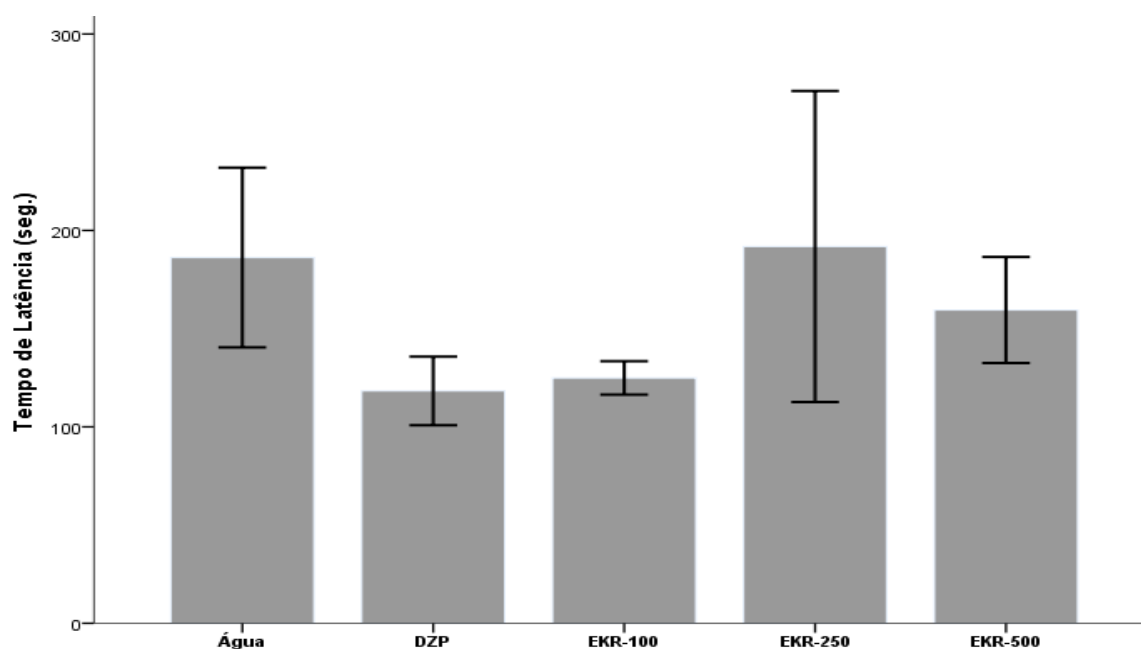


GRÁFICO 2: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o tempo de latência para início do sono no teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico em camundongos. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. (n=10) - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Gama).

A proporção geral de animais em estado de hipnose durante os 180 minutos ou 10800 segundos de observação pode ser verificada no gráfico 3, onde se lê que aproximadamente 50 % dos animais ainda dormiam ao final da observação (gráfico 3).

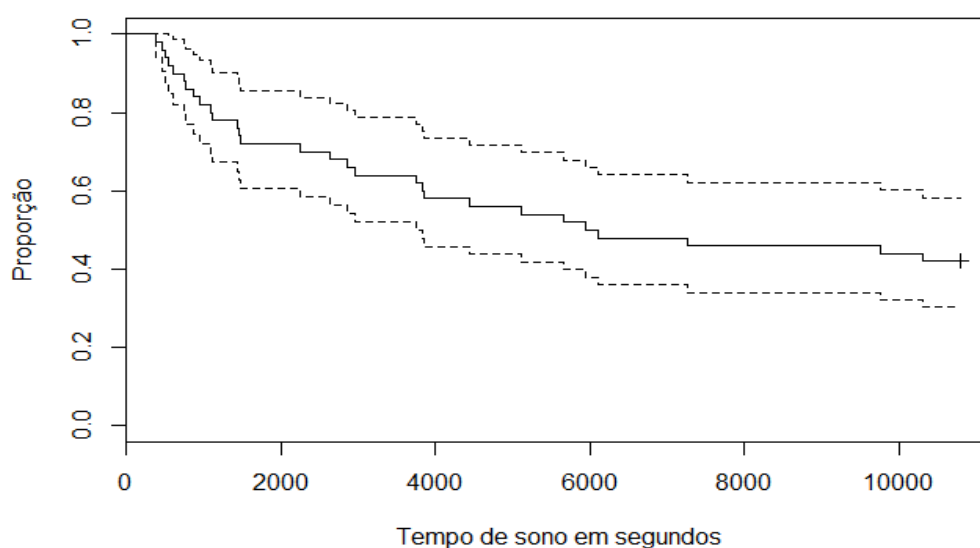


GRÁFICO 3: Proporção de camundongos em estado de hipnose durante 10800 segundos de observação no teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico com os tratamentos de água destilada, diazepam 5 mg/Kg (DZP) e *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR250, EKR500). Dados expressos em porcentagem, n = 50 (Teste Kaplan Meier)

O tempo de sono durante a observação foi reduzido em 20% pelo extrato na dose de 100 mg/Kg e em 26% pela dose de 500 mg/Kg, entretanto, apesar da tendência apresentada os valores não se mostraram significativamente maiores que os valores do grupo controle quando submetidos ao teste estatístico. Pelo gráfico 4 percebe-se que o grupo que ingeriu água tende a diferir dos demais, sendo que o tratamento por diazepam 5 mg/Kg prolongou significativamente o tempo de sono (gráfico 5).

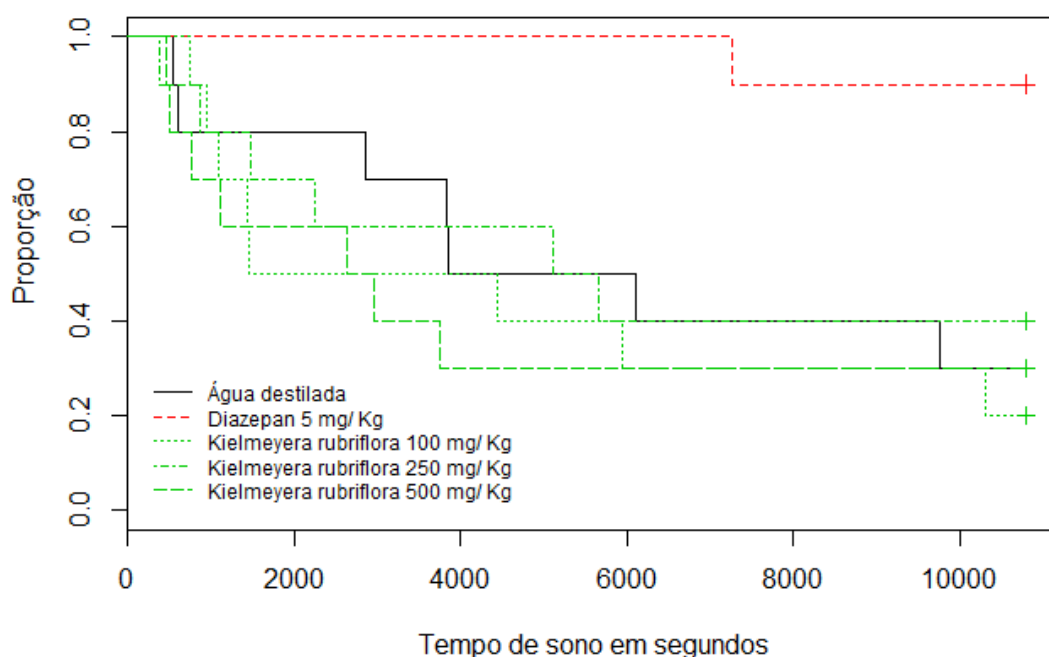


GRÁFICO 4: Proporção de camundongos em estado de hipnose por grupo estudado durante 10800 segundos de observação no teste de potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico. Dados expressos em porcentagem, n= 10 (Teste Kaplan Meier).

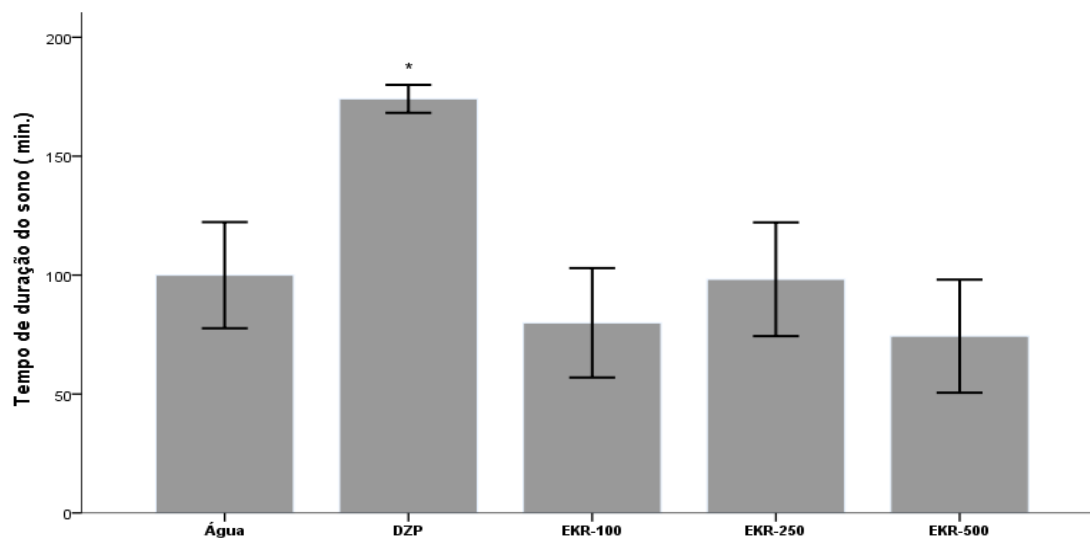


GRÁFICO 5: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o tempo de duração do sono durante a observação no teste de Potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental 80mg/Kg em camundongos. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05 (Teste Kaplan Meier).

6.2.2 Efeito do extrato de *K. rubriflora* no campo aberto

No teste do campo aberto foram avaliados: a atividade de ambulação ou número de quadrados atravessados com as quatro patas pelo animal, a quantidade de levantamentos e de autolimpezas. Os resultados avaliados entre os grupos experimentais foram comparados com os resultados do grupo água nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos.

Aos 30 minutos o número de quadrantes atravessados pelos animais foi significativamente aumentado nos grupos EKR-100 e EKR-500 e significativamente diminuído no grupo EKR-250, enquanto o diazepam não alterou este parâmetro.

Aos 60 minutos o número de quadrantes atravessados foi significativamente diminuído por diazepam e aumentado no grupo EKR-100, os outros grupos não apresentaram alteração.

Aos 120 minutos diazepam e EKR-500 aumentaram significativamente o número de quadrantes atravessados (tabela 4 e gráfico 6).

Grupo/dose mg/Kg	Nº quadrantes 30 minutos	Nº quadrantes 60 minutos	Nº quadrantes 120 minutos
Água 10 ml	31,80 ± 4,44	25,20 ± 9,44	19,00 ± 4,71
DZP 5	35,80 ± 16,69	19,70 ± 8,48**	25,40 ± 9,44**
EKR-100	38,30 ± 7,89*	32,40 ± 5,73**	21,20 ± 5,14
EKR-250	26,90 ± 6,04*	21,90 ± 7,40	16,90 ± 6,68
EKR-500	38,40 ± 3,04*	25,70 ± 6,57	23,80 ± 5,04*

TABELA 4 - Atividade de ambulação (número de quadrantes atravessados no teste do campo aberto). Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05, **P < 0,01.

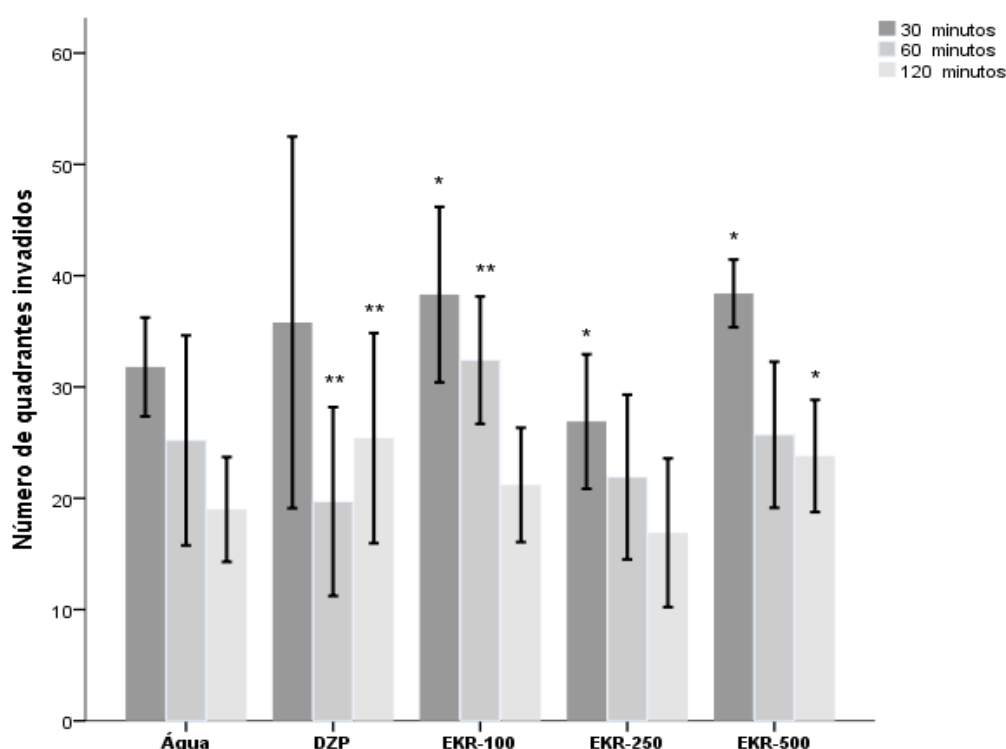


GRÁFICO 6: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre a atividade de ambulação em camundongos no teste do campo aberto nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05, **P < 0,01 - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Poisson).

A nítida diminuição da ambulação entre as observações ocorridas em todos os grupos a cada vez que os animais eram novamente expostos ao teste na caixa de atividade corrobora a relação entre exploração e exposição ao ambiente desconhecido que leva a desprezar os primeiros 5 minutos da primeira exposição do animal ao aparelho, pois, houve diferença significativa entre a primeira e a última exposição de cada grupo (ALMEIDA, 2006)

Em relação ao número de levantamentos, aos 30 minutos o número de levantamentos foi significativamente diminuído por diazepam e EKR-250. Aos 60 e 120 minutos apenas o

diazepam diminuiu significativamente o número de levantamentos. Foi perdida a leitura de um animal do grupo DZP aos 60 minutos (tabela 5 e gráfico 7).

Grupo/ dose mg/Kg	N ° de levantamentos 30 min.	N ° de levantamentos 60 min.	N ° de levantamentos 120 min.
Água 10 ml	20,80 ± 3,00	9,60 ± 2,82	8,10 ± 2,45
DZP 5	5,80 ± 2,89***	1,33 ± 0,90***	4,00 ± 2,23***
EKR-100	18,60 ± 2,28	11,80 ± 4,09	9,90 ± 2,90
EKR-250	16,20 ± 2,58*	9,20 ± 3,24	7,80 ± 3,82
EKR-500	21,70 ± 2,50	9,80 ± 2,82	8,80 ± 2,07

TABELA 5 – Número de levantamentos no teste do campo aberto. Dados expressos em média ± e.p.m. (n= 9/10) *P < 0,05, ***P < 0,001.

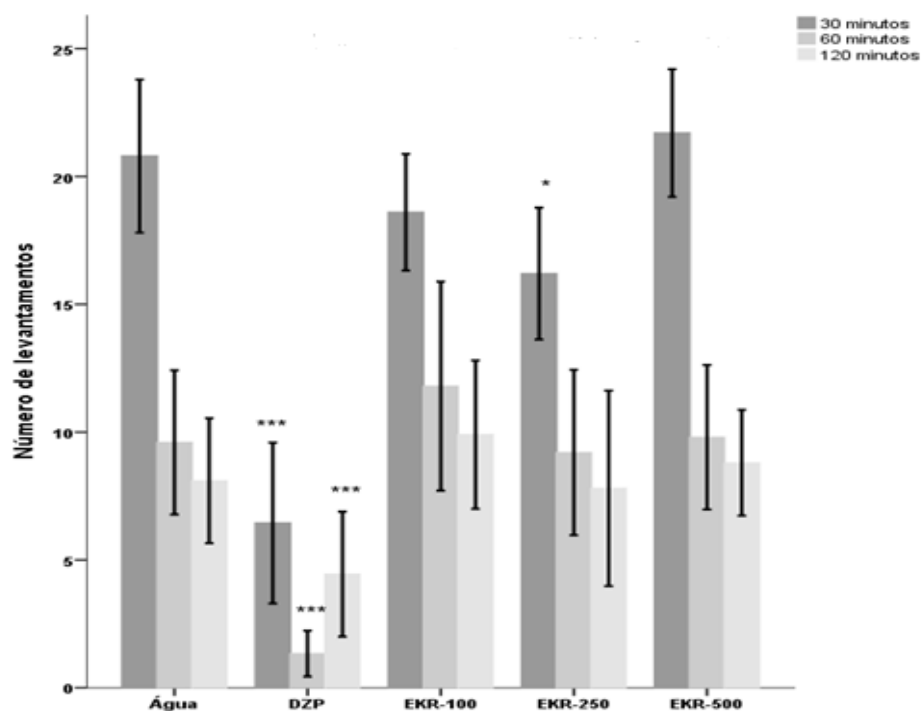


GRÁFICO 7: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de levantamentos em camundongos no teste do Campo aberto nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n= 9/10), *P < 0,05, **P < 0,01 - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Poisson).

Já quanto ao número de autolimpezas houve diminuição significativamente pelo diazepam em todas as leituras, nenhum dos extratos alterou este parâmetro. Foi perdida a leitura de um animal do grupo DZP aos 60 minutos (tabela 6 e gráfico 8).

Grupo/ dose mg/Kg	Nº autolimpezas 30 minutos	Nº autolimpezas 60 minutos	Nº autolimpezas 120 minutos
Água 10 ML	3,40 ± 0,72	2,90 ± 0,48	3,00 ± 0,91
DZP 5	0,50 ± 0,22***	0,78 ± 0,28**	0,90 ± 0,46**
EKR-100	3,00 ± 0,39	3,50 ± 0,65	2,10 ± 0,28
EKR-250	2,70 ± 0,42	2,10 ± 0,48	1,70 ± 0,30
EKR-500	3,80 ± 0,71	2,60 ± 0,73	2,20 ± 0,57

TABELA 6 – Número de autolimpezas no teste do campo aberto. Dados expressos em média ± e.p.m. (n=9/10) **P < 0,01, ***P < 0,001.

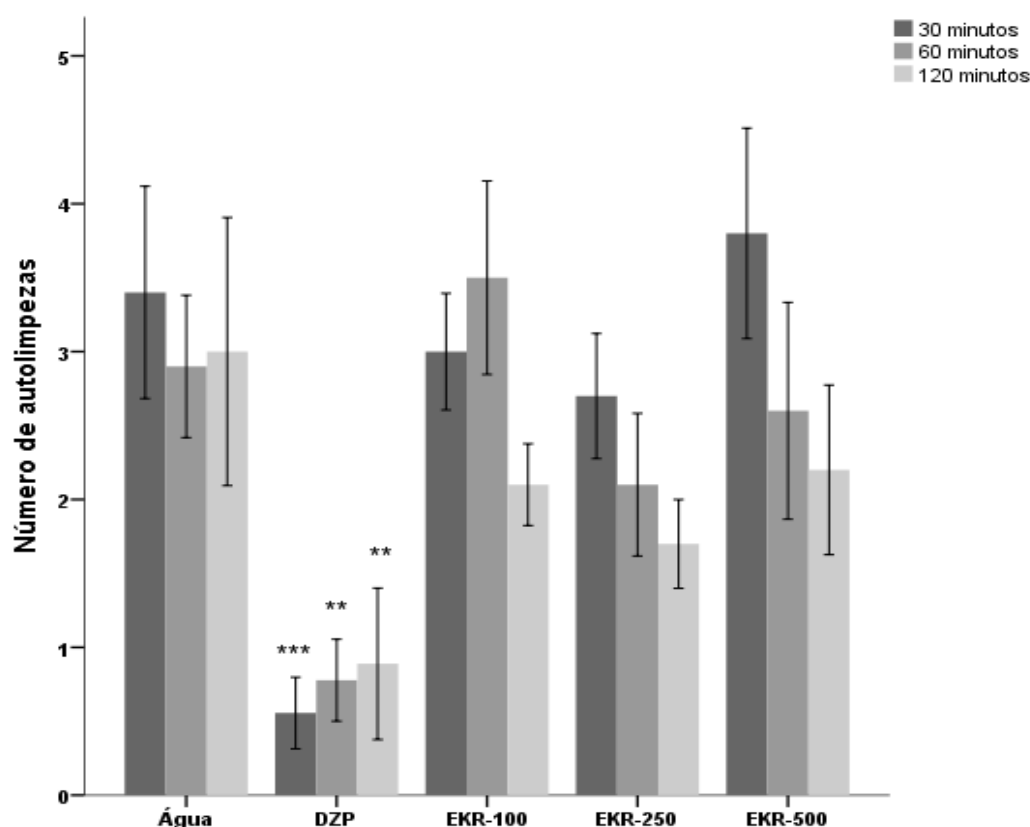


GRÁFICO 8: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de autolimpezas em camundongos no teste do Campo aberto nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n= 9/10), **P < 0,01, ***P < 0,001 – Teste ANOVA usando modelos lineares generalizados com link log (Poisson).

6.3 FASE III DO ESTUDO (Testes ansiolíticos de tratamento agudo)

6.3.1 Efeito do extrato de *K. rubriflora* na placa perfurada

Neste teste todos os tratamentos alteraram significativamente o número de mergulhos de cabeça quando comparados ao grupo tratado com água. Diazepam, EKR-250 e EKR-500

diminuíram o número de mergulhos de cabeça e EKR-100 aumentou o número de mergulhos de cabeça (tabela 7 e gráfico 9).

Grupo/ dose mg/Kg	Número de mergulhos
Água 10 ML	41,40 ± 3,67
DZP 5	23,90 ± 4,84 ***
EKR-100	48,90 ± 3,56*
EKR-250	31,20 ± 4,20***
EKR-500	35,70 ± 4,91*

TABELA 7 - Número de mergulhos na placa perfurada. Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10) *P < 0,05, ***P < 0,001.

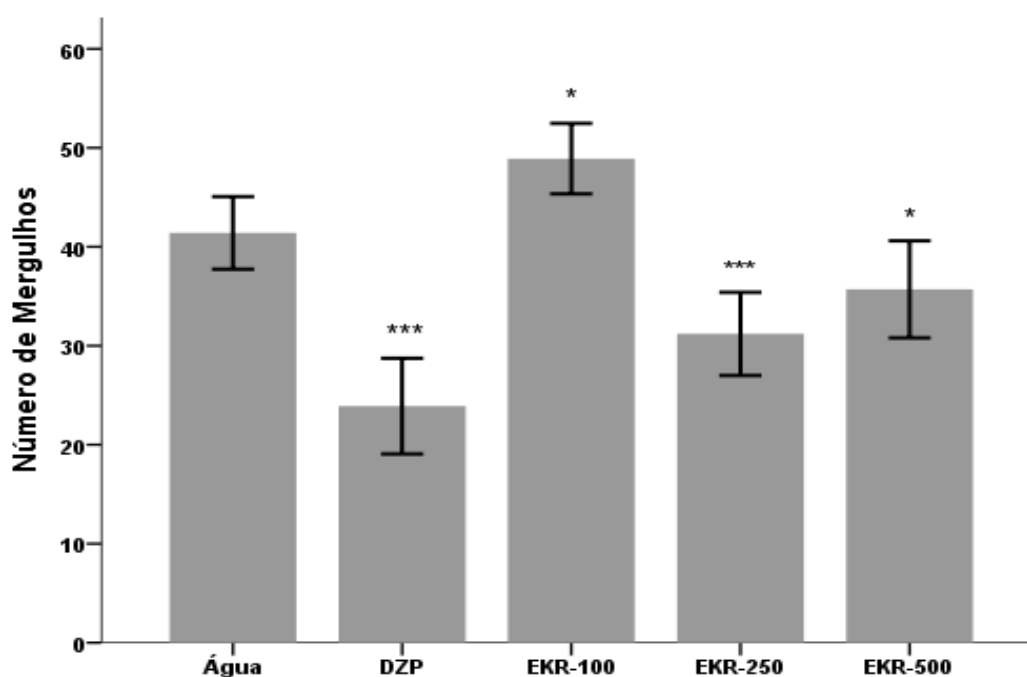


GRÁFICO 9: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de mergulhos de cabeça no teste da Placa perfurada. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05, ***P < 0,001 - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Poisson).

6.3.2 Efeito do extrato de *K. rubriflora* no labirinto em cruz elevado

O número de entradas nos braços abertos foi significativamente aumentado por EKR-250. O diazepam aumentou significativamente o número de entradas no centro e nos braços fechados do labirinto (tabela 8 e gráfico 10).

Grupo/ dose mg/Kg	Nº entradas braço aberto	Nº entradas centro	Nº entradas braço fechado
Água 10 ml	1,60 ± 0,54	12,30 ± 1,23	10,60 ± 1,14
DZP	1,90 ± 0,59	16,50 ± 2,37*	14,40 ± 2,11*
EKR-100	2,70 ± 1,12	15,20 ± 2,38	12,20 ± 1,47
EKR-250	5,00 ± 4,01***	12,40 ± 1,36	11,90 ± 1,09
EKR-500	1,00 ± 0,30	11,00 ± 0,83	10,90 ± 1,65

TABELA 8 - Teste do labirinto em cruz elevado (número de entradas). Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05, ***P < 0,001.

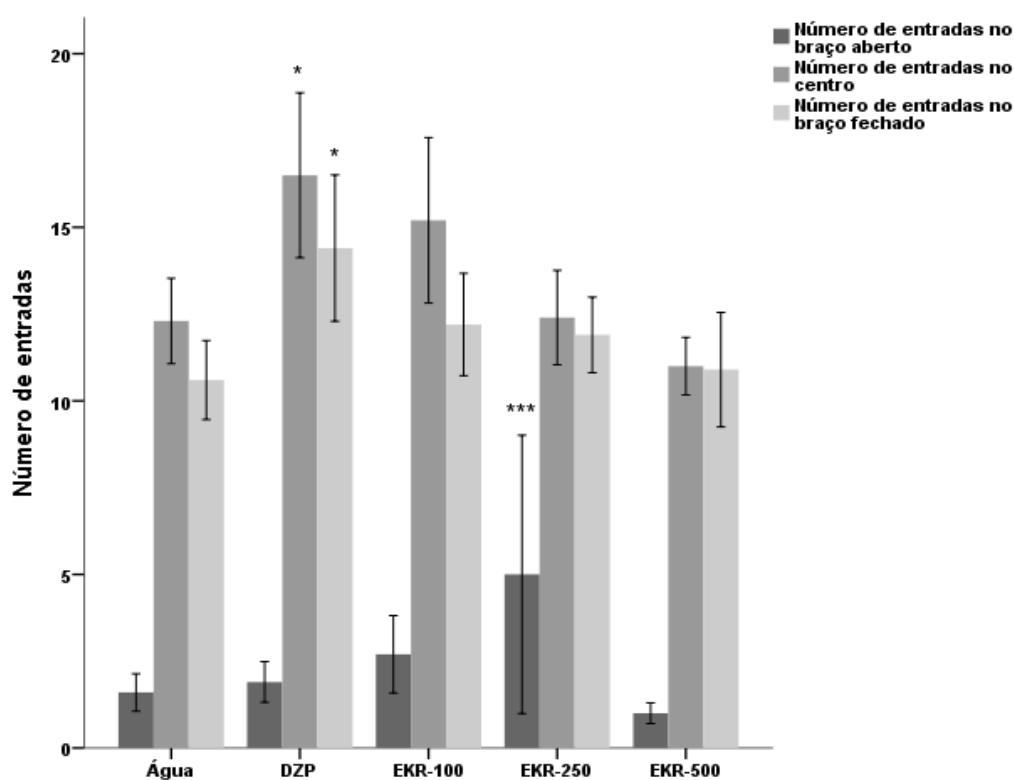


GRÁFICO 10: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o número de entradas nos braços abertos, centro e braços fechados no teste do Labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05, ***P < 0,001 - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Poisson).

O tempo de permanência nos braços abertos e no centro não foi alterado de forma significativa por nenhum dos tratamentos e o tempo de permanência nos braços fechados foi significativamente diminuído apenas pelo EKR-100 (tabela 9 e gráfico 11).

Grupo/ dose mg/Kg	Tempo braço aberto	Tempo centro	Tempo braço fechado
Água 10 ml	10,20 ± 3,77	95,70 ± 11,81	190,30 ± 15,21
DZP	12,40 ± 5,27	81,50 ± 7,58	206,10 ± 8,53
EKR-100	21,00 ± 6,24	121,30 ± 12,84	157,70 ± 11,13 *
EKR-250	8,60 ± 2,91	82,10 ± 11,03	205,60 ± 13,73
EKR-500	8,90 ± 3,08	88,80 ± 6,90	202,30 ± 6,62

TABELA 9 - Teste do labirinto em cruz elevado (tempo de permanência). Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05.

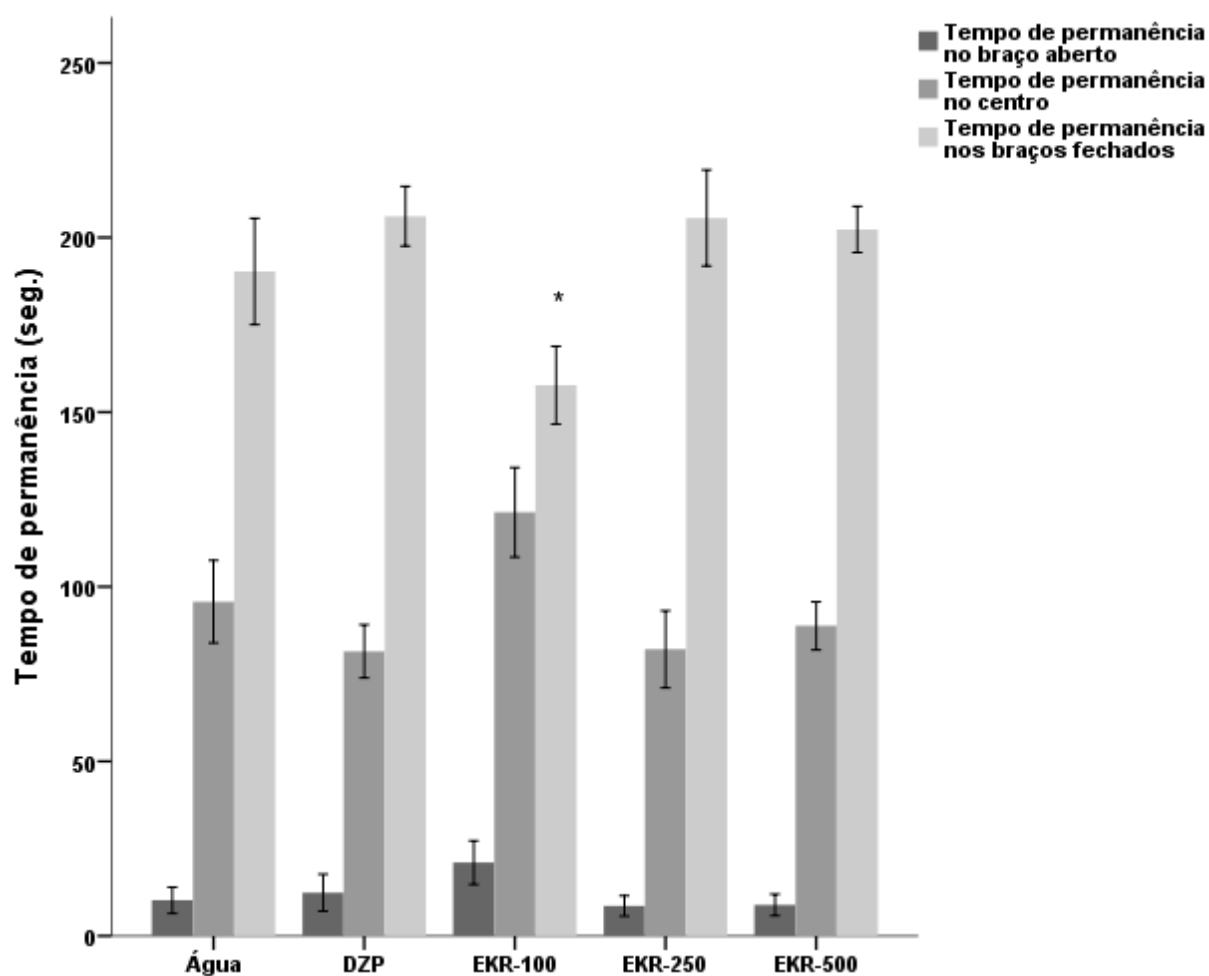


GRÁFICO 11: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e diazepam 5 mg/Kg (DZP) v.o. sobre o tempo de permanência nos braços abertos, centro e braços fechados no teste do Labirinto em cruz elevado. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), *P < 0,05 -Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Gama).

6.4 FASE IV DO ESTUDO (Testes antidepressivos de tratamento crônico)

6.4.1. Efeito do extrato de *K. rubriflora* no teste da suspensão da cauda

No teste da suspensão da cauda não houve alteração do tempo de imobilidade nos grupos de animais que receberam os extratos, entretanto, o grupo que recebeu fluoxetina 20 mg/Kg apresentou um tempo de imobilidade significativamente menor que o grupo que recebeu água (tabela 10 e gráfico 12).

Grupo/ dose mg/Kg	Tempo imobilidade
Água 10 ML	97,00 ± 15,78
FLX 20	27,80 ± 7,06**
EKR-100	86,80 ± 11,48
EKR-250	80,60 ± 11,84
EKR-500	77,90 ± 15,66

TABELA 10 - Teste de suspensão da cauda. Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10), **P < 0,01.

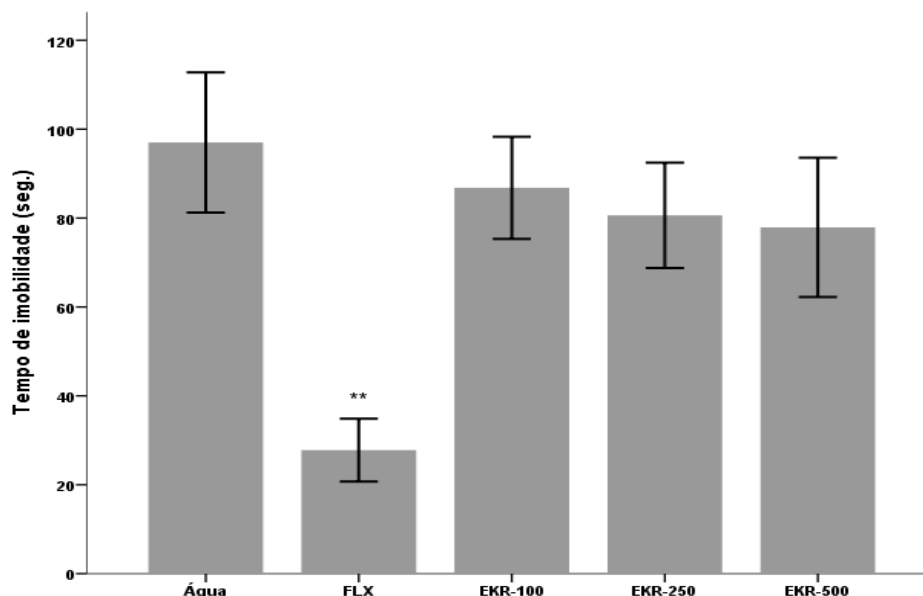


GRÁFICO 12: Efeito do extrato de *K. rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e fluoxetina 20mg/Kg (FLX) v.o. sobre o tempo de imobilidade no teste da Suspensão da cauda. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), **P < 0,01 - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Gama).

6.4.2 Efeito do extrato de *K. rubriflora* no teste do Nado Forçado

Neste teste o tempo de imobilidade foi significativamente diminuído em todos os grupos de tratamento quando comparados ao grupo tratado com água conforme demonstrado na tabela 11 e no gráfico 13.

Grupo/ dose mg/Kg	Tempo imobilidade
Água 10 ML	156,60 ± 12,07
FLX 20	46,50 ± 13,65**
EKR-100	30,50 ± 9,47***
EKR-250	82,10 ± 18,94*
EKR-500	75,10 ± 16,67*

TABELA 11 - Teste do nado forçado. Dados expressos em média ± e.p.m. (n=10). *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

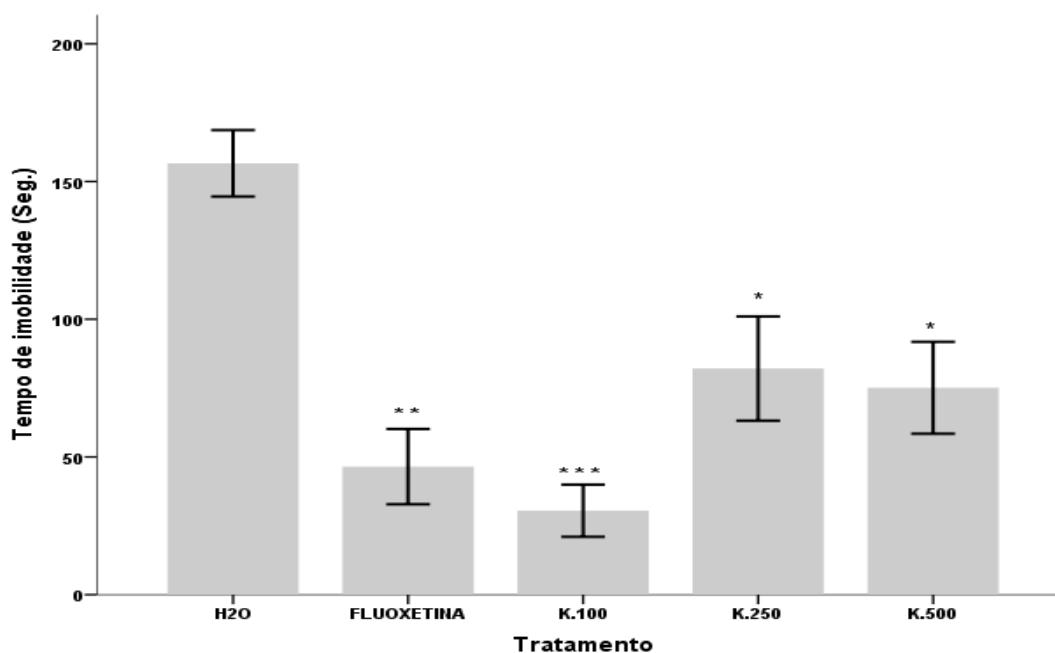


GRÁFICO 13: Efeito do extrato de *Kielmeyera rubriflora* nas doses de 100, 250 e 500 mg/Kg (EKR-100, EKR-250, EKR-500) e fluoxetina 20mg/Kg (FLX) v.o. sobre o tempo de imobilidade no teste do Nado forçado. Os valores estão expressos como média ± e.p.m. (n=10), *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001 - Teste Anova usando modelos lineares generalizados com link log (Gama).

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

7 DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Apesar da tecnologia disponível atualmente para síntese de novos fármacos, os produtos naturais continuam sendo um importante campo de pesquisa, sendo a estratégia mais bem sucedida para a descoberta de novos medicamentos. Sendo assim, as opções de produção de medicamentos a partir de produtos naturais vão de uso do extrato bruto que é composto por vários constituintes químicos, passando pelo uso de substâncias isoladas do extrato, pela modificação molecular de substâncias isoladas dos extratos vegetais, até a síntese completa de novas substâncias usando como protótipo uma molécula natural extraída de um produto natural (BARREIRO, 2009; PUPPO & GALLO, 2007). Neste sentido, fármacos utilizados para enfermidades do SNC como benzodiazepínicos, antidepressivos e antipsicóticos frequentemente apresentam efeitos indesejados. A busca de outras alternativas de medicamentos com mecanismos de ação não convencionais tem levado ao uso de fitoterápicos (FAUSTINO, ALMEIDA & ANDREATINI, 2010).

No presente estudo foi investigada a ação do extrato alcoólico das partes aéreas da *Kielmeyera rubriflora* sobre o SNC de camundongos. Inicialmente, foi realizada uma triagem geral de sinais indicativos de ação sobre o SNC utilizando-se do teste da triagem farmacológica comportamental, do teste de potencialização do tempo de sono induzido por tiopental sódico e do teste de movimentação espontânea. Em seguida, foram investigados os efeitos ansiolítico e sedativo através dos testes do labirinto em cruz elevado e da placa perfurada e a ação antidepressiva com os testes de nado forçado e suspensão da cauda. De forma geral, a triagem farmacológica comportamental apresentou comportamentos indicativos de ação do extrato sobre o sistema nervoso central. Os resultados dos testes aplicados sugerem efeitos estimulantes do SNC, os quais foram mais acentuados que os indicativos de efeitos depressores, excluindo assim alguns testes mais específicos. Os dados obtidos sugerem que, nas doses investigadas, a administração por via oral do extrato produza ações antidepressiva, ansiolítica e sedativa.

Os resultados do presente estudo sugerem que o extrato da *Kielmeyera rubriflora* produz efeitos diferenciados de acordo com a dose avaliada. Assim, a dose de 100 mg/Kg do extrato apresentou principalmente comportamentos indicativos de depressão do SNC, as doses de 250 mg/Kg e de 500 mg/Kg apresentaram principalmente sinais de estímulo do SNC. Como o extrato bruto é uma mistura complexa de constituintes, substâncias distintas podem ser os principais agentes das diferentes doses. Além do mais, como foi descrito anteriormente, na biogênese da ansiedade e da depressão estão implicados neurotransmissores em comum, bem como em seus tratamentos se encontram medicamentos em comum. Sendo assim, o resultado

deste teste indica que o extrato tanto pode ter ação depressiva como excitante do SNC, o que será confirmado pelos resultados dos outros testes: antidepressivo (ação excitatória do SNC) e ansiolítico e sedativo (ação depressiva do SNC).

Os testes de nado forçado e suspensão da cauda são os modelos mais utilizados para a pesquisa de antidepressivos. Em ambos os testes a imobilidade é um estado depressivo em resposta à situação inescapável em que o animal é colocado. De modo geral drogas de ação antidepressiva são capazes de prolongar o tempo em que o animal apresenta comportamento de fuga que é inversamente proporcional ao tempo de imobilidade (CASTAGNÉ, MOSER, & PORSOLT, 2009). No teste de nado forçado todas as doses do extrato, apresentaram ação antidepressiva demonstrada pela diminuição significativa do tempo de imobilidade dos animais. O EKR-100 apresentou o melhor resultado, pois foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade dos animais em 80%. A fluoxetina, usada como controle positivo, reduziu a imobilidade em 70% e os demais extratos em cerca de 50%. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo do extrato etanólico de *Curcuma longa* L. onde o tempo de imobilidade no teste de nado forçado apresentou uma curva em forma de U invertida. A concentração cerebral de 5-HT acompanhou a redução do tempo de imobilidade apresentando a mesma curva e demonstrando a correlação entre este neurotransmissor e a atividade antidepressiva (XIA *et al.*, 2007). O mesmo ocorreu no estudo da *Glycyrrhiza glabra*, o efeito antidepressivo (redução significativa do tempo de imobilidade) apareceu na dose de 150 mg/Kg, sendo que nas doses de 75 e de 300mg/Kg não houve efeito (DHINGRA & SHARMA, 2006). Portanto, os dados encontrados no presente trabalho sugerem a propriedade antidepressiva no material estudado.

A redução da imobilidade no teste de nado forçado pode estar relacionada ao aumento de atividade locomotora (BUENO, 2005). No entanto a hipótese de um falso positivo é descartada, pois, apesar do EKR-100 apresentar aumento de ambulação espontânea e redução da imobilidade no teste do nado forçado, os EKR-250 e EKR-500 apresentaram resultados opostos na ambulação e semelhantes no teste do nado forçado. Assim, o resultado indicativo de ação antidepressiva do extrato estudado não foi influenciado pela atividade motora do animal.

Além do efeito antidepressivo haver sido bastante evidenciado no teste do nado forçado, o teste da suspensão da cauda que usa os mesmos princípios aponta uma tendência à redução do tempo de imobilidade nos grupos tratados com extrato, entretanto esta redução não foi significativa. Segundo CRYAN, MOMBÉREAU & VASSOUT, 2005, a curva bifásica, curva hormética ou curva em forma de U invertido que usualmente aparece no teste de nado forçado não aparece usualmente no teste de suspensão da cauda, a exemplo da imipramina que apresenta padrão linear com a suspensão da cauda e curva em forma de u invertido com o nado forçado.

No presente estudo ambos os testes mostraram os padrões indicados, apesar dos valores não atingirem a significância estabelecida no teste de suspensão da cauda. Portanto, os resultados estão em conformidade com os estudos atuais desta natureza.

O teste de suspensão da cauda não atingiu a mesma significância do teste de nado forçado, o que pode ser explicado pelo tempo de administração, pois, YU, KONG & CHEN, 2002, ao estudarem os efeitos antidepressivos do extrato aquoso da *Curcuma longa* obtiveram resultados positivos no teste de nado forçado à partir do 7º dia de administração, enquanto o resultado positivo no teste da suspensão da cauda só apareceu aos 14 dias de administração.

A dose de 250 mg/Kg diminuiu a atividade de ambulação em todos os tempos de observação indicando um efeito sedativo, entretanto a diferença significativa só foi observada aos 30 minutos. O diazepam, usado como controle positivo neste mesmo teste, também apresentou o fenômeno de hormese com ação sedativa aos 60 minutos e ansiolítica aos 120 minutos quando sua concentração plasmática devia ser menor que aos 60 minutos. A atividade exploratória e de locomoção no teste na caixa de movimentação espontânea e no campo aberto foi correlacionada por meio de análises multifatoriais por LACERDA, 2006. No referido trabalho a imobilidade na periferia do campo aberto foi significativamente aumentada tanto pelo aumento de doses do diazepam (sedativo) como pelo pentilenotetrazol (ansiogênico), significando que tanto ansiedade como sedação produzem o mesmo tipo de sinal neste equipamento (diminuição de ambulação), portanto os sinais devem ser analisados em um contexto e não isoladamente.

A diminuição dos comportamentos de autolimpeza e levantamentos na caixa de atividade junto à diminuição da ambulação é característica de ação sedativa da droga, neste caso a autolimpeza foi diminuída significativamente apenas pelo diazepam e os levantamentos pelo diazepam e pelo extrato na dose de 250 mg/Kg sugerindo ação sedativa do diazepam e do extrato nas doses de 5 mg/ Kg e 250 mg/Kg, respectivamente.

No teste da placa perfurada a atividade sedativa é caracterizada por diminuição do número de mergulhos de cabeça (ALNAMER *et al.*, 2012; ADEYEMI *et al.*, 2010). No presente estudo os EKR-250 e EKR-500 e o diazepam 5 mg/Kg usado como controle positivo apresentaram atividade sedativa ou diminuição do número de mergulhos de cabeça.

A fim de esclarecer melhor os sinais de ação sedativa evidenciados pelo extrato foi aplicado outro teste geral, o teste da potencialização do tempo de sono induzido por barbitúricos, os resultados mostraram que durante o tempo de observação apenas o diazepam foi capaz de prolongar significativamente o tempo de sono induzido pelo tiopental sódico 80 mg/Kg sugerindo que o extrato em questão não possua atividade hipnótica. Entretanto, diferente

do resultado obtido, a atividade sedativa evidenciada no teste de ambulação geralmente é acompanhada pela propriedade do extrato de potencializar o tempo de sono induzido (SHARMEN *et al.*, 2014; HA *et al.*, 2006; KANNAN, MANICKAM & RAJAMOHAMMED, 2014; HOSSEINZADEH, SHAHANDEH & SHAHSAVAND, 2012).

O fato do extrato de *Kielmeyera rubriflora* apresentar efeito sedativo na caixa de movimentação espontânea e na placa perfurada e não potencializar o tempo do sono induzido pelo tiopental e até mesmo o reduzir ligeiramente levanta suspeitas de que o extrato possua propriedades de indução das enzimas hepáticas metabolizadoras. Efeito semelhante foi encontrado no extrato de *Hypericum perforatum*, conhecido por suas propriedades antidepressivas (MENNINI & GOBBI, 2004), quando administrado de forma aguda foi capaz de diminuir os quadrantes atravessados pelos animais no teste de ambulação indicando atividade sedativa e como no presente estudo não alterou o tempo de sono induzido por barbitúrico, quando administrado cronicamente por 14 dias o tempo de duração do sono foi reduzido, a esta redução do tempo de sono foi atribuída a propriedade indutora enzimática do extrato (RAŠKOVIĆ *et al.*, 2014).

A administração crônica de extratos indutores enzimáticos por poucos dias é capaz de reduzir o tempo de sono induzido por barbitúricos, pois estes são metabolizados mais rapidamente levando o animal a acordar em tempo reduzido em comparação aos que receberam apenas controle, o extrato de *Cleome viscosa* administrado por 4 dias e o fitoterápico Yahom Tultavai por 7 dias reduziram significativamente o tempo de sono induzido por barbitúricos (SIRISANGTRAGUL & SRIPANIDKULCHAI, 2013; GUPTA & DIXIT, 2009). Estes dados apontam a pesquisa para um posterior caminho onde o teste de potencialização do tempo de sono deve ser repetido com administração crônica do extrato para verificar se há redução significativa do tempo de sono e como alternativa para a pesquisa de efeito hipnótico, um teste de potencialização do tempo de sono induzido por outra substância indutora de sono que não sofra metabolização hepática, como por exemplo o éter etílico, para esclarecer se o extrato realmente não tem ação indutora de sono. O éter etílico não sofre metabolização hepática e portanto sua ação hipnótica não é influenciada pela indução enzimática (MOREIRA, 2010).

A ação ansiolítica do extrato foi demonstrada na caixa de atividade e na placa perfurada. Embora os dados do teste do labirinto em cruz elevado estejam dissonantes com outros dados da literatura, seu resultado também sugere ação ansiolítica. Quando colocados na caixa de atividade os animais que receberam a dose de 100 mg/Kg de extrato de *Kielmeyera rubriflora* apresentaram aumento significativo da atividade de ambulação nas observações ocorridas aos 30 e aos 60 minutos após a administração do tratamento indicando um maior comportamento

exploratório decorrente de efeito ansiolítico. Aos 120 minutos este efeito não foi observado provavelmente por metabolização da droga, sugerindo que os efeitos teriam uma duração de ação. Fugindo ao resultado que se esperava, interessantemente, a dose de 500mg/Kg apresentou efeito ansiolítico aos 30 e 120 minutos, neste caso possivelmente trata-se de efeito produzido por um componente ou conjunto de componentes diferente dos que agem nas doses de 100 e 250 mg/Kg e que nesta concentração está em quantidade suficiente para produzir um efeito farmacológico que suplanta a sedação causada pela dose de 250 mg/ Kg. Como o extrato é uma mistura complexa em altas doses outras substâncias podem mascarar os efeitos dos componentes principais. No teste da placa perfurada a atividade ansiolítica é caracterizada pelo aumento do número de mergulhos de cabeça resultante do aumento de atividade exploratória (YAŞAR, 2013) No presente estudo o EKR-100 apresentou atividade ansiolítica (aumento de mergulhos de cabeça).

No teste do labirinto em cruz elevado o EKR-250 aumentou significativamente o número de entradas no braço aberto sem todavia alterar o número de entradas nos braços fechados. O EKR-100 diminuiu o tempo de permanência nos braços fechados. Ambos os fatores são indicativos de efeito ansiolítico (GRAEFF & GUIMARÃES, 1999; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, 2003). Entretanto, a frequência nos braços abertos é bem menor que o esperado em todos os grupos experimentais quando comparado a outros estudos usando o labirinto em cruz elevado (SOUTO-MAIOR, 2011; LIMA *et al.*, 2013; MOREIRA, 2008). O diazepam 5 mg/Kg foi usado como controle positivo mas não apresentou atividade ansiolítica, pois, de acordo com o resultado dos outros testes, nesta dose o diazepam tem ação sedativa. O experimento foi realizado sob as regras de boas práticas de manipulação de animais e seguiu as mesmas condições ambientais dos outros experimentos. No intuito de verificar se a interferência por ventura seria do manipulador alguns animais foram colocados no labirinto por outros colaboradores havendo contato com o manipulador de costume somente durante a gavagem, no entanto esta medida não alterou a frequência de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (dados não mostrados). Estes dados colocam em xeque a validade do modelo, portanto, apesar dos dados apresentarem diferenças significativas entre os extratos e o controle, os resultados não foram satisfatórios o suficiente para considerar que o teste revelou uma ação ansiolítica da droga.

Lembrando que no teste de nado forçado o melhor efeito foi observado na administração da menor dose, as observações na caixa de atividade e na placa perfurada reforçam as diferenças entre as doses. A diferença de comportamento frente às doses provavelmente se deve ao fenômeno de hormese onde a dose maior produz efeito sedativo e a menor efeito ansiolítico.

Estudos farmacológicos com outros medicamentos e outros extratos de plantas medicinais demonstraram resultados com perfil hormético ou curva dose-resposta em forma de U invertido foram encontrados em outras experimentações. MOREIRA, 2010, estudou o extrato de *Croton celtidifolius*, quando houve um decréscimo dose dependente da atividade motora espontânea quando expostos à caixa de atividade e no campo aberto, as doses mais baixas do extrato aumentaram a locomoção e atividade exploratória enquanto as doses mais altas diminuíram estes efeitos. Da mesma forma, o óleo essencial de *Mentha piperita* L. evidenciou um efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, enquanto em concentrações maiores o efeito não foi observado, sendo assim o fenômeno de hormese foi mais uma vez observado (FERREIRA, 2010). Este tipo de resultado pode ocorrer até mesmo em estudo com outras espécies, como o *Danio rerio*. Num estudo com esta espécie o etanol e as drogas benzodiazepínicas clonazepam e diazepam produziram efeitos ansiolíticos que desapareceram quando as suas doses foram aumentadas produzindo uma curva hormética (MÁXIMO *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que este trabalho é uma contribuição inicial sobre a ação da *Kielmeyera rubriflora* no SNC. A atividade ansiolítica geralmente está associada a modulação da transmissão GABAérgica e os efeitos antidepressivos comumente estão associados à transmissão serotoninérgica. Para melhor conhecimento de suas utilidades terapêuticas faz-se necessário o estudo dos mecanismos de ação do extrato.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Considerando os dados experimentais obtidos na presente investigação conclui-se que a administração por via oral do extrato etanólico das partes aéreas de *Kielmeyera rubriflora* Cambess em camundongos apresenta um duplo perfil dose-dependente de composto depressor e excitatório do sistema nervoso central. O extrato demonstrou ação ansiolítica e sedativa com administração aguda, contudo não foi possível concluir se possui ou não atividade indutora de sono. A administração crônica do extrato apresentou efeito preditivo de resposta antidepressiva em todas as doses investigadas.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- ABREU, M. H. N. G; ACURCIO, F. A.; RESENDE, V. L. S. Utilização de psicofármacos por pacientes odontológicos em Minas Gerais. **Revista Pan-Americana de Salud Publica**. v. 7, n. 1, p. 17-23, 2000.
- ADEYEMI, O. O.; AKINDELE, A., J.; YEMITAN, O., K.; AIGBE, F., R.; FAGBO, F. I. Anticonvulsivant, anxiolytic and sedative activities of the aqueous root extract of *Securidaca longepedunculata* Fresen. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 130, p. 191-195, 2010.
- ALMEIDA & BARBOSA-FILHO, 2006 in ALMEIDA, R. N. (org.) **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2006.
- ALMEIDA, R. N. (org.) **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2006.
- ALNAMER, R.; ALAOU, K.; BOUIDIDA, E. H.; BENJOUAD, A.; CHERRAH, Y. Sedative and hypnotic activities of the methanolic and aqueous extracts of lavandula from Morocco. **Advances in Pharmacological Sciences**. v. 2012, p. 01-05, 2012.
- ANDREATINI, R.; BLANCHARD, C.; BLANCHARD, R.; BRANDÃO, M. I.; CAROBREZ, A. P.; GRIEBEL, G. The brain decade in debate: II. Panic or anxiety? From animal models to a neurobiological basis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p. 145-154, 2001.
- AKHILA, J. S.; DEEPA, S.; ALWAR, M. C. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. **Current Science**. v. 93, n. 7, p. 917-920, 2007.
- BARREIRO, J. E. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**. v. 32, n. 3, p. 679 – 688, 2009.
- BENEDITO, R. B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. 2009. f. 83. Dissertação em produtos naturais e biossintéticos- Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- BENTLEY, S. M.; PAGALILAUAN, G. L.; SIMPSON, S. A. Major Depression. **Medical Clinics of North America**. v. 98, p. 981-1005, 2014.
- BIERSDORF, C.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Assessment of anxiolytic and panicolytic effects of dichloromethane fraction from stems of *Kielmeyera coriacea*. **Phytomedicine**. v. 19, p. 374-377, 2012.
- BIRADAR, S. M.; JOSHI, H.; CHEDA, T. K. Neuropharmacological effect of Mangiferin on brain cholinesterase and brain biogenic amines in the management of Alzheimer's disease. **European Journal of Pharmacology**. v. 683, p.140-147, 2012.

BRAGA, J. E. F.; PORDEUS, L. C.; SILVA, A. T. M. C.; PIMENTA, F. C. F. E.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N. Ansiedade Patológica: Bases Neurais e Avanços na Abordagem Psicofarmacológica - Pathological Anxiety: Neural Bases and Advances in Psychopharmacological. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 14, n. 2, p. 93-100, 2010.

BRANDÃO, M. G. L. **Plantas medicinais e fitoterápicos: aspectos gerais e métodos de validação**. Belo Horizonte: O Lutador. 2009.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. v. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos e Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006a.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006b. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências.

BUENO, A. X. **Efeitos do extrato aquoso obtido das folhas da *Hyptis pectinata* (sambacaitá) sobre o Sistema Nervoso Central de camundongos**. 2005. f. 94. Dissertação em Ciências da Saúde – Programa de Pós Graduação em Medicina. Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão.

BUCCAFUSCO, J. J. **Methods of Behavior analysis in neuroscience**. 2 ed. Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis Group. 2009.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA-JR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios (The drug development in Brazil: Challenges). **Gazeta médica da Bahia**. v.78, suplemento 1, p. 98-106, 2008.

CARLINI, E. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier. 1973.

CASTAGNÉ, V.; MOSER, P.; PORSOLT, R. D. **Chapter 6. Behavioral Assessment of Antidepressant Activity in Rodents**. In BUCCAFUSCO J. J. **Methods of Behavior analysis in neuroscience**. 2 ed. Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis Group. 2009.

CASTELÃO, J. F.; GOTTLIEB, O. R.; LIMA, R. A.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIEB, H. E.; WENKERT, E. Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species C NMR spectroscopy of xanthenes. **Phytochemistry**. v. 16, p. 735-740, 1977.

CHATTERJEE, M.; SINGH, S.; KUMARI, R.; VERMA, A. K.; PALIT, G. Evaluation of the antipsychotic potential of *Panax quinquefolium* in ketamine induced experimental psychosis model in mice. **Neurochemical Research**. v. 37, p. 759-770, 2012.

COQUEIRO, A.; REGASINI, L. O.; SKRZEK, S. C. G.; QUEIROZ, M. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, W. S. Free Radical Activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). **Molecules**. v. 18, p. 2376-2385, 2013.

CONCEA **Diretrizes da prática da eutanásia do CONCEA**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. Brasília. 2013.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução normativa n.15, de 16 de dezembro de 2013. Baixa a Estrutura Física e Ambiente de Roedores e Lagomorfos do Guia Brasileiro de Criação e Utilização de Animais para Atividades de Ensino e Pesquisa Científica.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 29, p. 571-625, 2005.

DE DEUS, J. M. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Ministério do Meio Ambiente/Secretaria de Biodiversidade e Florestas: Brasília. 2011.

DENT, E.; HOOGENDIJK, E. O. Psychosocial factors modify the association of frailty with adverse outcomes: a prospective study of hospitalised older people. **BMC Geriatrics**. v.14, n. 1, 2014. < <http://www.biomedcentral.com> > acesso em 22.10.2014

DI STASI, L. C. (org.) **Plantas medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo multidisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP. 1996.

DHINGRA, D.; SHARMA, A. Antidepressant-like activity of *Glycyrrhiza glabra* L. in mouse models of immobility tests. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 30, p. 449-454, 2006.

EVANGELISTA, N. L. S.; GONÇALVES, M. V. F. A.; FERNANDES, D. N.; MARINHO, B. M.; GREGÓRIO, L. E. Fitoquímica preliminar da espécie vegetal *Kielmeyera rubriflora* Camb. (Clusiaceae). **II Semana de Integração (Sintegra): UFVJM (Resumo)**, 2013. CD ROM

FAUSTINO, T. T., ALMEIDA, R. B., ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento de transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 32, n. 4, p. 429- 436, 2010.

FERNANDES, E. G. R. B. **Síntese e elucidação estrutural de xantonas, xantolignóides e determinação da atividade biológica**. 1996. f. 239. Dissertação em Química Farmacêutica - Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto.

FERREIRA, G. F. **Avaliação das atividades ansiolítica e antidepressiva dos óleos essenciais de *Mentha piperita* L. e *Cananga odorata* (Lam.) Hook. f. & Thomson em camundongos por via inalatória.** 2010. f. 54. Dissertação em Ciências Biológicas (AC: Farmacologia) – Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, J. F. A.; CARVALHO-JR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; COELHO, M. A. N.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; ATEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. (org.) **Catálogo de plantas e fungos do Brasil.** Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 1, 2010.

GENTRY, A. H <<http://www.tropicos.org>> acesso em 25/08/2014

GOODMAN, L. S., GILMAN, A. **GOODMAN & GILMAN: As bases farmacológicas da terapêutica.** 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda. 2005.

GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. *Advances in psychopharmacology: mechanism of action of psychoactive drugs today.* **Revista Brasileira de Psiquiatria.** v. 21, n. 1, 1999.

GOTTLIEB, O. R; LINS MESQUITA, A. A; NAGEM, T. J. *Guttiferae*: Xanthones from *Kielmeyera rubriflora*. **Phytochemical reports.** v. 10, p. 2253-2255, 1971.

GOTTLIEB, O. R; NAJEM, T. J. 2-hydroxi-3,4-dimethoxyxanthone from *Kielmeyera* species. **Revista Latinamericana de Química.** v. 8, p. 137-138. 1977.

GOULART, Y. C. F.; MARTINS, J. V. C.; SANTOS, A. R.; MOREIRA, Y. L.; CALIXTO, J. B.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Involvement of Serotonin in the Antidepressant-like Effect of Extract from *Kielmeyera coriacea* Stems. **Pharmaceutical Biology.** v. 45, n. 3, p.169-175, 2007.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da Psicofarmacologia.** São Paulo: Atheneu. 1999.

GUPTA, N. K. & DIXIT, V. K. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cleome viscosa* Linn. Extract. **Indian Journal of Pharmacology.** v. 41, n. 1, p. 36-40, 2009.

HA, J. H., LEE, M. G., CHANG, S. M., LEE, J. T. *In vivo* Characterization of sedative activities of *Fossilia Mastodi* Osis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin.** v. 29, n. 7, p. 1414-1417, 2006.

HOSSEINZADEH, H., SHAHANDEH, S., SHAHSAVAND, S. Anxiolytic and hypnotic effects of aqueous and ethanolic extracts of aerial parts of *Echium italicum* L. in mice. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products.** v. 7, n. 2, p. 71-79, 2012.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 2002.

KANNAN, S., MANICKAM, S., RAJAMOHAMMED, M. A. Anxiolytic, sedative, and hypnotic activities of aqueous extract *Morinda citrifolia* fruit. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**. v. 5, n. 2, p. 73-75, 2014.

KESSLER, R. C.; BERGLUND, P.; DEMLER, O.; JIN, R.; KORETZ, D.; MERIKANGAS, K. R.; RUSH, A. J.; WALTERS, E. E.; WANG, P. S. The Epidemiology of Major Depressive Disorder: Results From the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**. v. 289, n. 23, p. 3095-3105, 2003.

KILLEEN, T. J.; GARCIA E. E.; BECK, S. G. **Guía de Arboles de Bolivia**. La Paz: Herbario Nacional de Bolivia. Missouri Botanical Garden. 1993.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas in SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC. 2007.

LACERDA, G. F. M. L. **Ansiedade em modelos animais: Efeito de drogas nas dimensões extraídas da análise fatorial**. 2006. f. 63. Dissertação em farmacologia - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LENZE, E. J.; WETHERELL, J. L. A lifespan view of anxiety disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. v. 13, p. 381-399, 2011.

LIMA, N. G. P. B.; DE SOUSA, D. P.; PIMENTA, F. C. F.; ALVES, M. F.; DE SOUSA, F. S.; MACEDO, R. O.; CARDOSO, R. B.; MORAIS, L. C. S. L. MELO DINIZ, M. F. F.; ALMEIDA, R. N. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 103, p. 450-454, 2013.

MARONA, H.; SZKARADEK, N.; RAPACZ, A.; FILIPEK, B.; DYBAŁA, M.; SIWEK, A.; CEGŁA, M.; SZNLELER, E. Preliminary evaluation of pharmacological properties of some xanthone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 17, p. 1345 -1352, 2009.

MARONA, H.; PEKALA, E.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L.; WALCZAK, M.; SZNELER, E. Anticonvulsant activity of some xanthone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 7234-7244, 2008.

MARTINS, J.; OTOBONE, F. J.; SELA, V. R.; OBICI, S.; TROMBELLI, M. A.; GARCIA CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A. Behavioral effects of *Kielmeyera coriacea* extract in rats. **Indian Journal of Pharmacology**. v. 38, p. 427-428, 2006.

MASSART, R.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 367, p. 2485-2494, 2012. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405682/>> acesso em 29.10.2014

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas: Sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** Fortaleza: Ed Ver e atual.1998.

MÁXIMO, C.; SILVA, B. A. W.; GOUVEIA-JR, A.; HERCULANO, A. M. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio reio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & biological psychiatry.** v. 35, p. 624-631, 2011.

MENEZES, G. B.; FONTENELLE, L. F.; VERSIANI, M. Trans-cultural aspects of social anxiety disorder and related conditions: a Brazilian case series and review of international clinical studies. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria.** v. 44, n. 3, p. 196-200, 2006.

MENNINI T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life Science.** v. 75, n. 9, p. 1021-1027, 2004.

MESQUITA, L. M.; ARAÚJO, R. M.; BEZERRA, D. P.; FILHO, R. B.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFFO, L. V. C.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxicity of γ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 19, p. 623-630, 2011.

MINAS GERAIS. Secretaria de Estado de Saúde e Gestão do SUS/MG. Aprova a Política Estadual de Práticas Integrativas e Complementares. Resolução SES-MG nº 1885, de 27 de maio de 2009.

MOREIRA, R. M. **Depleção cerebral de serotonina durante o período neonatal programa a homeostase metabólica energética e a expressão comportamental de ratos adultos.** 2008, f. 81. Dissertação em Medicina Veterinária - Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MOREIRA, E. L. G. **Avaliação farmacológica de uma fração rica em proantocianidinas obtida da *Croton celtidifolius* sobre o sistema nervoso central e em modelo animal de Doença de Parkinson.** 2010. f. 54. Dissertação em Farmacologia – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MULULO, S. C. C.; MENEZES, G. B.; VIGNE, P.; FONTENELLE, L. F. A review on predictors of treatment outcome in social anxiety disorder. **Revista Brasileira de Psiquiatria** v. 34, n. 1, p. 92-100, 2012.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet.** v. 349, p. 1436-42, 1997a.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet.** v. 349, p. 1498–1504, 1997b.

NAGEM, T. J. **Desmetilações seletivas de metoxixantonas por piperidina aquosa. (RESUMO)** Tese de Doutorado. UFMG: Belo Horizonte. 1973. *In* EMBRAPA. <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>> acesso em 27.08.14

NÚÑEZ, M. B.; MAGUNA, F. P.; OKULIK, N. B.; CASTRO, E. A. QSAR modeling of the MAO inhibitory activity of xanthon derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p. 5611–5617, 2004.

OBICI, S.; OTOBONE, F.; MARTINS, J. V. C; AUDI, E. A. Avaliação da fração diclorometano de caule de *Kielmeyera coriacea* em testes C. in Universidade Estadual de Maringá/Pró- Reitoria de extensão de **XI Encontro Anual de Iniciação Científica. Maringá. Pesquisa e Pós-Graduação**. 2002.

OLIVEIRA, A. P.; MARIMON, B. S. Ecologia da polinização de *Kielemyera rubriflora* camb. Car. Major saddi (Clusiaceae) em Nova Xavantina, Matogrosso, Brasil. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**: Brasília, v. 10, p. 16-30, 2002. In **EMBRAPA**. <<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>> acesso em 27.08.14

PINHEIRO, L.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P.; FERREIRA, A. G.; YOUNG, M. C. M; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial Xantones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). **Memórias do instituto Oswaldo cruz**. v. 98, n. 4, p. 549-552, 2003.

PINTO, B. A. S. **Estudo psicofarmacológico do extrato bruto das cascas de *Himathantus drasticus* MART.** 2011. f. 67. Dissertação em Saúde e Ambiente. Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

PRINA, A. M.; FERRI, C. P.; GUERRA, M.; BRAYNE, C.; PRINCE, M. Prevalence of anxiety and its correlates among older adults in Latin America, India and China: cross-cultural study. **The British Journal of Psychiatry**. v. 199, n. 6, 2011.

PUPPO, M. T. & GALLO, M. B. C. Biologia Química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química nova**. v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAŠKOVIĆ, A., CVEJIĆ, J., STILINOVIĆ, N., GOLOČORBIN-KON, S., VUKMIROVIĆ, S., MIMICA-DUKIĆ, N., MIKOV, M. Interaction between different extracts of *Hypericum perforatum* L. from Serbia and Pentobarbital, Diazepam and Paracetamol. **Molecules**. v. 19, p. 3869-3882, 2014.

RIBEIRO, R. F. **Sertão, lugar desertado. O Cerrado na cultura de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Autentica. 2006.

RODRIGUES, Â. G.; AMARAL, A. C. F. **Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia**. in **BRASIL. Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas Integrativas e Complementares. Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Cadernos de Atenção Básica, nº 31. Brasília. 2012.

RODRIGUES, C. L. **Aspectos neuropsicológicos dos transtornos de ansiedade na infância e adolescência: um estudo comparativo entre as fases pré e pós- tratamento medicamentoso**. 2011. f. 121. Dissertação em Psiquiatria – Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SAINT-HILAIRE, A. **Viagem ao distrito dos Diamantes e Litoral do Brasil**. 2 ed. Belo Horizonte: Editora Itatiaia. 2004.

SELA, V. R.; HATTANDA, I.; ALBRECHT, C. M.; DE ALMEIDA, C. B.; OBICI, S.; CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A. Effect of xanthone from *Kielmeyera coriacea* stems on serotonergic neurons of the median raphe nucleus. **Phytomedicine**. v. 17, p. 274-278, 2010.

SHARMEN, F. MANNAN, A. RAHMAN, M. CHOWDHURY, A. U.; UDDIN, M. E.; AHMED, A. Investigation of *in vivo* neuropharmacological effect of *Alpinia nigra* leaf extract. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 4, n. 2, p. 137-142, 2014.

SILVA-JÚNIOR, C. A. **Epidemiologia dos subtipos de depressão: análise de classes latentes dos sintomas depressivos em uma amostra populacional da região metropolitana de São Paulo**. 2012. f. 220. Tese em Psiquiatria - Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SIRISANGTRAGUL, W.; SRIPANIDKULCHAI, B. Modulatory effect of thai traditional medicine (yahom tultavai) on hepatic cytochrome p 450 enzymes and pentobarbital-induced sleeping in mice. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative medicines**. v.10, n. 4, p. 128-136, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Victor Emanuel Carlson. 2003.

SOUTO-MAIOR, F. N. **Atividade ansiolítica e antinociceptiva do óxido de linalol em modelos animais**. 2011. f. 120. Tese em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APGII. 2 ed.** Nova Odessa SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2008.

TABORDA, C.; MEHNERT, D. U.; SILVA, C. A. **Manual de Normas Técnicas. Biotério de Experimentação Animal**. Departamento de Microbiologia Instituto de Ciências Biomédicas. USP. 2004. <http://www3.icb.usp.br/bmm/arquivos/tecnicas_bio.pdf> acesso em 27/07/2014

TOLEDO, C. E. M.; BRITTA, E. A.; CEOLE, L. F.; SILVA, E. R.; MELLO, J. C. P.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and citotoxic activities of medicinal plants of Brazilian cerrado, using cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 133, p. 420-425, 2011.

TOMIĆ, M.; TOVILOVIĆ, G.; BUTOROVIĆ, B.; KRSTIĆ, D.; JANKOVIĆ, T.; ALJANČIĆ, I.; MENKOVIĆ, N. Neuropharmacological evaluation of diethylether extract and xanthones of *Gentiana kochiana*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 81, p. 535-542, 2005.

WOOD, J. R. I. (ORG); MAMANI F., POZO, P.; SOTO, D.; WOOD, J. R. I. **Guía Darwin de las plantas de los cerrados de la Chiquitania**. Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado: Santa Cruz. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health atlas 2005**. Geneva: World Health Organization. 2005

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Mental health atlas 2011**. Geneva: World Health Organization. 2011

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2014. Disponível em: <www.who.int> acesso em 10 08. 2014

XIA, X.; CHENG, G.; PAN, Y.; XIA, Z. H.; KONG, L. D. Behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of the ethanolic extract from *Curcuma longa* L. in the mouse forced swimming test. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, p. 356-363, 2007.

YAŞAR, Ş. N.; CAN, Ö. D.; OSTÜRK, N.; SAGRATINI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; MAGGI, F. Central Nervous System activities of *Hypericum origanifolium* extract via GABAergic and Opioidergic mechanisms. **Phytoterapy Research**. v. 27, p. 877-884, 2013.

YU, Z. F.; KONG, L. D.; CHEN, Y. Antidepressant activity of aqueous of *Curcuma longa* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, p. 161-165, 2002.

ZAGOTO, J. N.; BRACHT, A.; PAGADIGORRIA, C. L. S.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; CORTEZ, D. A. G.; YAMAMOTO, N. S. Effects of the *kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat liver. **Journal of ethnopharmacology**. v. 105, p. 47-54, 2006.

ZHANG, H.; LIU, B.; WU, J.; XU, C.; TAO, J.; DUAN, X.; CAO, Y.; DONG, J. Icariin inhibits corticosterone-induced apoptosis in hypothalamic neurons via the PI3-K/Akt signaling pathway. **Molecular Medicine reports**. v. 6, p. 967-972, 2012

ANEXO

ANEXO I: Exsicata da *Kielmeyera rubriflora* - Herbário Jeanine Felfili da UFVJM

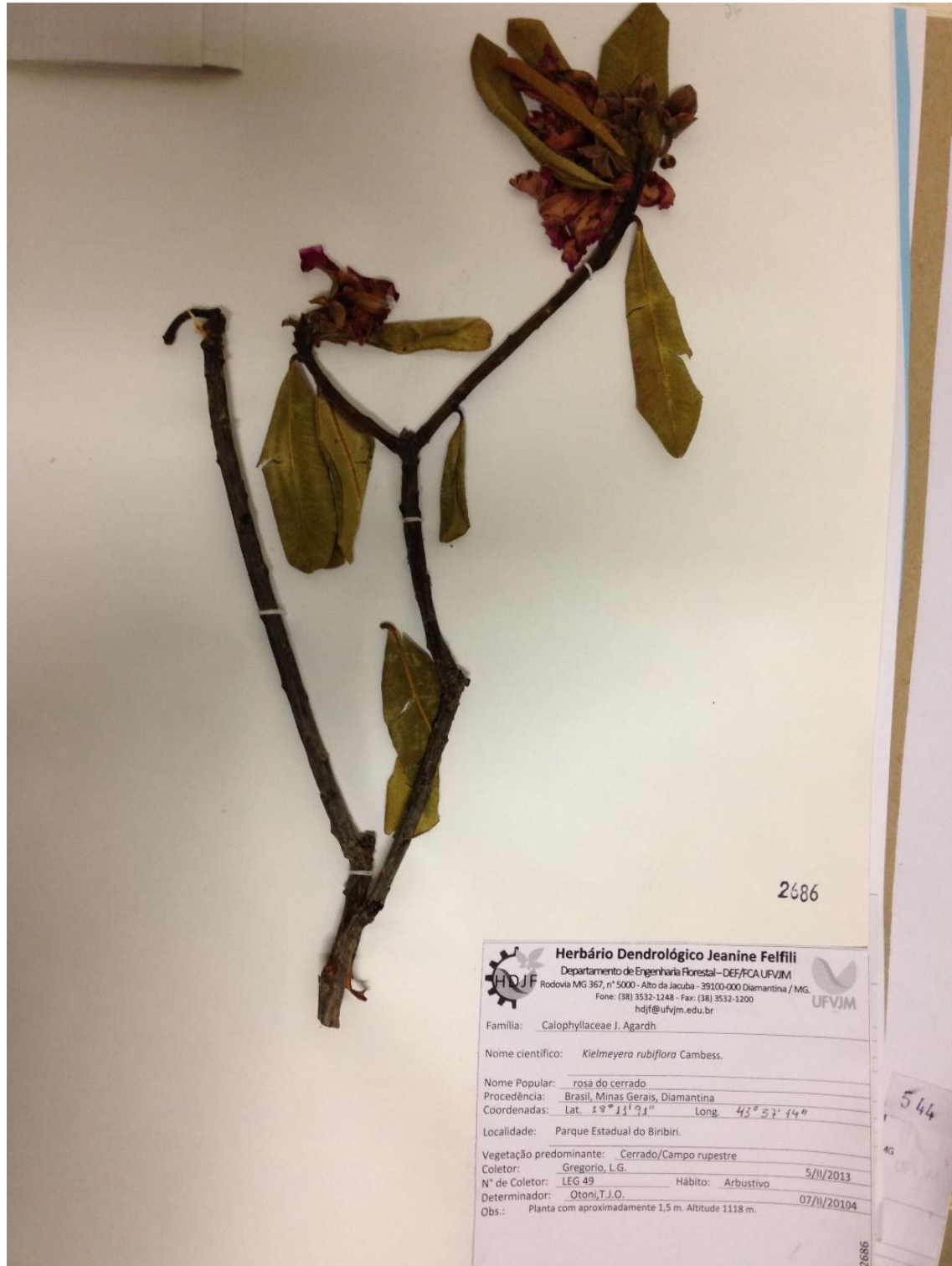


FIGURA14: Exsicata da *Kielmeyera rubriflora*.